

Doktori (*Ph.D.*) értekezés



Varga Norbert

okleveles vegyész

**Makromolekulás kolloidokból felépülő hatóanyag hordozó
rendszerek tervezése**

Témavezető:

Dr. Csapó Edit

egyetemi adjunktus

Kémia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék

Szeged

2020

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
Ábra- és táblázatjegyzék	6
1. Bevezetés	11
2. Irodalmi áttekintés	13
2.1. Kolloid részecskék, mint gyógyszerhatóanyag hordozók	13
2.2. Makromolekulás (polimer alapú) hatóanyag hordozók	17
2.2.1. Polimer alapú nanorészecskék jellemzése	17
2.2.2. Polimer alapú nanorészecskék előállítási lehetőségei	18
2.2.3. Polimer nanorészecskék előállítása folyamatos áramú, áramlásos kémiai mikroreaktorban	21
2.3. PLA/PLGA és Hialuronsav alapú rendszerek jellemzése	22
2.3.1. PLA/PLGA alapú hatóanyag hordozó rendszerek	22
2.3.2. HyA alapú kolloid rendszerek	25
3. Célkitűzés	28
4. Felhasznált anyagok, szintézisek és vizsgálati módszerek	30
4.1. Felhasznált anyagok	30
4.2. Szintézisek	32
4.2.1. Poli(laktid-ko-glikolid) kopolimerek szintézise	32
4.2.2. PLA/PLGA hordozó rendszerek szintézise nanoprecipitációs módszerrel	32
4.2.3. PLGA50 részecskék előállítása áramlásos rendszerben	34
4.2.4. Térhálósított nátrium-hialuronát részecskék előállítása	35
4.2.5. M-HyA/CTAB kompozit részecskék előállítása	35
4.3. Vizsgálati módszerek és mérési körülmények	36
4.3.1. A hordozó rendszerek jellemzésére szolgáló módszerek és technikák	36
4.3.2. Részecskék méretének és szerkezetének meghatározása	40
4.3.3. Kapszulázási hatékonyság és in vitro hatóanyag kioldódási vizsgálatok	41
4.3.4. Egyéb alkalmazott műszeres technikák	43
5. Eredmények	45
5.1. A szintetizált PLA/PLGA polimerek karakterizálása és az előállított PLA/PLGA részecskék jellemzése az oldószer, stabilizátor és hidrofilítási tulajdonságok függvényében	45
5.1.1. A szintetizált PLA és PLGA polimerek karakterizálása	45
5.1.2. Hatóanyag nélküli PLA/PLGA részecskék jellemzése	49
5.1.3. Hatóanyag-tartalmú PLA/PLGA részecskék jellemzése	52

5.2. Mag-héj szerkezetű TP-tartalmú PLA/PLGA részecskék előállítási protokolljának optimalizálása és szerkezeti jellemzésük	55
5.2.1. Nanoprecipitációs technikával előállított TP- tartalmú PLA/PLGA részecskék koncentráció függő előállítási protokolljának optimalizálása.....	55
5.2.2. TP-tartalmú PLGA50 részecskék előállítása áramlásos kémiai technikával.....	60
5.2.3. TP-tartalmú PLA/PLGA részecskék szerkezeti karakterizálása.....	63
5.2.4. TP in vitro kioldódási vizsgálata PLA/PLGA részecskékből	66
5.3. Keresztkötött és CTAB –dal részlegesen hidrofóbizált HyA nanorészecskék előállítása, szerkezetvizsgálata és felhasználásuk KP kapszulázására	68
5.3.1. Keresztkötött HyA nanorészecskék előállítása és karakterizálása.....	68
5.3.2. CTAB -dal neutralizált HyA nanorészecskék előállítása és karakterizálása	71
5.3.3. HyA alapú rendszerek reológiai tulajdonságai.....	75
5.3.4. HyA alapú rendszerek in vitro hatóanyag kioldódási tulajdonságai	79
5.4. Hialuronsav - kitozán poliszacharid alapú hordozó rendszerek előállítása és jellemzése	81
5.4.1. HyA-Chit között kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatások jellemzése	81
5.4.2. HyA-Chit hatóanyag hordozó rendszerek előállítása és jellemzése.....	86
6. Összefoglaló	89
7. Summary	93
8. Irodalomjegyzék	97
9. Melléklet	106
10. Köszönetnyilvánítás.....	109
11. Publikációs lista	110

Rövidítések jegyzéke

Anti-EGFR: anti epidermális növekedési faktor receptor

BSA: marha szérum albumin

Chit: kitozán

cl-HyA: keresztkötött hialuronsav

CTAB: cetil-trimetil-ammónium-bromid

DLS: dinamikus fényszórás

DSC: differenciális pásztázó kalorimetriás

DTA: differenciális termoanalitika

DTG: derivatív termogravimetria

EDC metil-jodid: 1-[3-(dimetil-amino)propil]-3-etil-karbodiimid-metil-jodid

EDEA: 2,2'-(etiléndioxi)bisz(etilamin)

FT-IR: Fourier-transzformációs infravörös (spektroszkópia)

GA: glikolid

H-Chit: nagy molekulatömegű kitozán

H-HyA: nagy molekulatömegű nátrium-hialuronát

HRTEM: nagyfelbontású transzmissziós elektronmikroszkópia

HTCC: N-(2-hidroxi-propil)-3-trimetil-ammónium-kloriddal módosított kitozán

HyA: hialuronsav

IBU: ibuprofen

ITC: izoterm titrációs kalorimetria

KP: ketoprofen

KYNA: kinurénsav

LA: laktid

LDH: réteges kettős hidroxid

M-Chit: közepes molekulatömegű kitozán

Mg/Al LDH: magnézium/alumínium réteges kettős hidroxid

M-HyA: közepes molekulatömegű nátrium-hialuronát

Milli-Q víz: ultratiszta Milli-Q víz (fajlagos ellenállás: 18,2 mΩ×cm 25 °C-on)

NMR: mágneses magrezonancia (spektroszkópia)

NSAID: nem-szteroid gyulladáscsökkentő hatóanyag

O/V: olaj a vízben emulzió

PBS: foszfát puffer (pH= 7,4, 0,9 % NaCl)

- PCL:** polikaprolakton
- PDT:** fotodinamikai terápia
- PEC:** polielektrolit komplex
- PEG:** polietilén-glikol
- PEI:** polietilénimin
- PLA:** poli(tejsav)
- PLGA:** poli(laktid-ko-glikolid)
- PLGA50:** poli(laktid-ko-glikolid) (laktid:glikolid arány 50:50)
- PLGA65:** poli(laktid-ko-glikolid) (laktid:glikolid arány 65:35)
- PLGA75:** poli(laktid-ko-glikolid) (laktid:glikolid arány 75:25)
- PLUR:** Pluronic F127
- PNIPAM:** poli(*N*-izopropil-akrilamid)
- PNIPAM-*b*-PCL-*b*-PNIPAM:** poli(*N*-izopropil-akrilamid)-poli(ϵ -kaprolakton)- poli(*N*-izopropil-akrilamid)
- PSS:** nátrium-polisztirol-szulfonát
- PVA:** polivinil alkohol
- RESOLV:** szuperkritikus folyadék gyors expanziója folyadékban
- RESS:** szuperkritikus folyadék gyors expanziója
- ROP:** gyűrűfelnyitási polimerizáció
- SEM:** pásztázó elektronmikroszkópia
- SH-HyA:** tiolcsoporttal rendelkező hialuronsav
- TEM:** transzmissziós elektronmikroszkópia
- TG:** termogravimetria
- TP:** (\pm)- α -tokoferol
- TPGS:** *D*- α -tokoferol-polietilén-glikol-1000-szukcinát
- TPP:** tripolifoszfát
- UCNPs:** felkonvertáló nanorészecskék
- UV-Vis:** ultraibolya-látható (spektrofotometria)
- V/O/V:** víz/olaj/víz duplaemulzió
- V/O:** víz az olajban emulzió
- ζ -potenciál:** elektrokinetikai potenciál (Zéta-potenciál)

Ábra- és táblázatjegyzék

1. ábra: A „polimer alapú hordozó nanorészecskék” témában megjelent publikációk számának változása 1996-2019 között 5281db publikáció alapján.....	11
2. ábra: A nanoszerkezetű hatóanyag hordozót-tartalmazó termékek fejlődése a liposzómális hordozórendszerek megismerésétől napjainkig [9].....	14
3. ábra: Hatóanyag hordozóként alkalmazható rendszerek sematikus ábrái	14
4. ábra: BSA/HyA komplex kolloid részecskék előállításának sematikus ábrája (bal oldal) és a képződő kolloid részecskék szerkezeti tanulmányozásának eredményei az alkalmazott m_{BSA}/m_{HyA} tömegarány függvényében (jobb oldal) [25]	16
5. ábra: Polimer alapú hordozó rendszerek előállítási lehetőségei makromolekulákból....	18
6. ábra: Polimer részecskék előállítására alkalmazott hagyományos technika (bal oldal) és a folyamatos áramlásos mikroreaktor általános sematikus ábrája (jobb oldal).....	21
7. ábra: PLA/PLGA makromolekulák gyűrűfelfnyitós polimerizációval (ROP) történő szintézisének sematikus ábrája	23
8. ábra: HyA és SH-HyA-héjjal rendelkező inzulin/HTCC részecskék előállítása folyamatos működésű „nanokomplexálási” technikával és a részecskékről készített TEM képek [101]	27
9. ábra: A hordozó rendszerek előállításához használt polimerek monomer egységei és a hatóanyagok szerkezeti képletei	31
10. ábra: A PLGA50 kopolimer alapú kolloid részecskék előállításához használt Syrris Asia Flow áramlásos rendszer sematikus ábrája.....	34
11. ábra: A PLA/PLGA polimerek és a ciklikus dimerek (A) FT-IR spektrumai és (B) DSC görbéi.....	46
12. ábra: (A) A PLGA65 és a PLGA75 kopolimerek törésmutató értékei a koncentráció függvényében és (B) a Rayleigh-Gans-Debye egyenlet (1. egyenlet) grafikus ábrázolása	47
13. ábra: 1,4-dioxánban oldott (A) PLGA75 és (B) PLGA65 precipitációs görbéi (titrálószer: Milli-Q víz, titrálandó oldat: $V = 5 \text{ mL}$, $c_{PLGA} = 5 \text{ mg/mL}$)	48
14. ábra: A PLA/PLGA polimerek peremszög értékei a felületre cseppentett $10 - 10 \mu\text{L}$ térfogatú vízcseppekre meghatározva	49
15. ábra: A különböző stabilizátorok mellett előállított PLGA75 részecskék reprezentatív ζ -potenciál értékei tisztítás (A) előtt és (B) után (szerves fázis: $V = 1,5 \text{ mL}$, $c_{PLGA75} = 10 \text{ mg/mL}$, vizes fázis: $V = 15 \text{ mL}$, $c_{stabilizátor} = 0,1 \text{ mg/mL}$).....	51

16. ábra: Különböző stabilizátorok felhasználásával előállított PLA részecskék reprezentatív TEM felvételei eltérő nagyítások mellett (szerves fázis: acetone, $c_{PLA}=10$ mg/mL, $V=1,5$ mL, vizes fázis: $c_{stabilizátor}=0,1$ mg/mL, $V=15$ mL)	52
17. ábra: Nanoprecipitációs eljárással előállított, hatóanyag-tartalmú PLA és PLGA részecskék TEM képei és a feltételezhető szerkezet sematikus (nem méretarányos) ábrái (szerves fázis: $c_{PLA/PLGA}=10$ mg/mL, $V=1,5$ mL; vizes fázis: $C_{PLUR}=0,1$ mg/mL, $V=15$ mL; $m_{hatóanyag}=7,5$ mg).....	54
18. ábra: Nanoprecipitációval előállított TP-tartalmú PLA részecskékről készült reprezentatív TEM képek a különböző komponens koncentrációk mellett (PLA függés: $c_{TP}=2,5$ mg/mL, $c_{PLUR}=0,1$ mg/mL, TP függés: $c_{PLA}=10$ mg/mL, $c_{PLUR}=0,1$ mg/mL, PLUR függés: $c_{PLA}=10$ mg/mL, $c_{TP}=2,5$ mg/mL)	57
19. ábra: (A) TP- és (B) PLA- tartalmú oldatok turbiditás értékei a PLUR koncentráció függvényében (vizes közeg, $T=25$ °C, $c_{TP}=0,25$ mg/mL, $c_{PLA}=0,25$ mg/mL)	58
20. ábra: Nanoprecipitációval előállított TP- tartalmú PLA/PLGA részecskék méreteloszlási görbéi és a PLGA75/TP és PLGA65/TP mintákról készült TEM felvételek ($c_{PLGA}=10$ mg/mL, $c_{TP}=2,5$ mg/mL, $c_{PLUR}=0,1$ mg/mL)	59
21. ábra: Nanoprecipitációval előállított TP-nélküli és TP-tartalmú PLGA50 részecskék méreteloszlása és TEM felvételei (szerves fázis: $c_{PLGA50}=5$ mg/mL $c_{TP}=1,25$ mg/mL; vizes fázis: $c_{PLUR}=0,1$ mg/mL).....	61
22. ábra: Különböző $v_1:v_2$ áramlási sebességeken elkészített TP-tartalmú PLGA50 részecskék reprezentatív TEM képei (szerves fázis: $c_{PLGA50}=5$ mg/mL, $c_{TP}=1,25$ mg/mL; vizes fázis: $c_{PLUR}=0,1$ mg/mL).	62
23. ábra: A PLA és TP-tartalmú PLA részecskék liofilizált pormintáinak FT-IR spektrumai (szerves fázis: $c_{PLA}=10$ mg/mL, vizes fázis: $c_{PLUR}=0,1$ mg/mL).....	63
24. ábra: TP turbiditás változása PLUR-tartalmú vizes (25 °C (A)) és PBS (pH= 7,4; 0,9 w/w% NaCl; 25 °C (B)) és 37 °C (C)) oldatokban ($c_{TP}=0,05$ mg/mL).....	64
25. ábra: A PLUR cmc értékének meghatározása Milli-Q vizes (▲) és PBS (●) közegben ($t=25$ °C).....	65
26. ábra: A különböző TP-tartalmú PLA/PLGA részecskékből a hatóanyag PBS közegben regisztrált kioldódási görbéi (● jelölt), illetve a mérési pontokra (A) Korsmeyer-Peppas és (B) Weibull kinetikai modellekkel történő illesztések (szaggatott vonallal jelölt) ($T=37$ °C, pH= 7,4; 0,9 % NaCl; $c_{PLUR}=1$ mg/mL) (#: folyamatos áramlásos technikával előállított részecskék).....	66

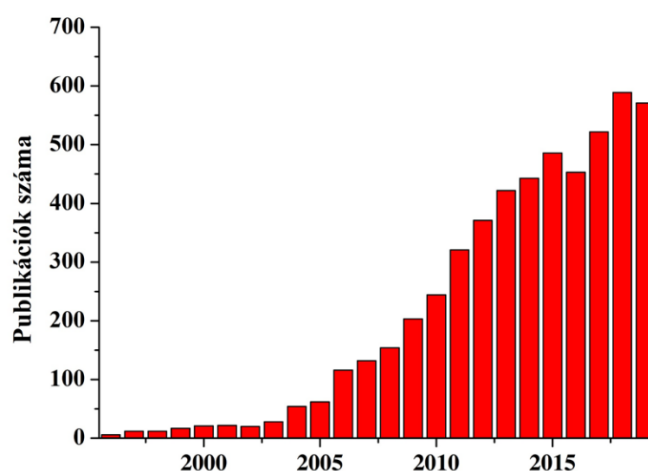
27. ábra: A liofilizált és 75% -ban keresztkötött M-HyA (cl-M-HyA/75%) és a kiindulási M-HyA FT-IR spektrumainak részlete (bal oldal) illetve a szintézis sematikus ábrája (jobb oldal).....	69
28. ábra: A 75% -ban keresztkötött M-HyA (cl-M-HyA/75% (piros)), a keresztkötő EDEA komponens (fekete) és a M-HyA (kék) (A) TG, (B) DTG és (C) DSC görbéi.....	70
29. ábra: (A) A különböző mértékben keresztkötött M-HyA nanorészecskék méreteloszlása, illetve (B) cl-M-HyA/100% részecskékről készült TEM felvétel és (C) a meghatározott számszerinti méreteloszlás	71
30. ábra: A HyA CTAB-dal történő neutralizálásának sematikus ábrája.....	71
31. ábra: (A) M-HyA nélküli és (B) M-HyA tartalmú rendszerekben a CTAB cmc értékének meghatározása konduktometriás módszerrel ($c_{\text{HyA, kezdeti}} = 0,1 \text{ mg/mL}$)	72
32. ábra: Az ITC mérésekből nyert kalorimetriás entalpia görbék (A) 5 mM és (B) 12 mM koncentrációjú CTAB titráló oldatok mellett ($T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $c_{\text{HyA, kezdeti}} = 0,1 \text{ mg/mL}$) (a HyA nélküli mérést a kék vonal jelzi).....	73
33. ábra: M-HyA látszólagos viszkozitási görbéje állandó nyírási sebesség mellett ($c_{\text{HyA, kezdeti}} = 0,1 \text{ mg/mL}$, $c_{\text{CTAB, titráló oldat}} = 25 \text{ mM}$)	73
34. ábra: M-HyA/CTAB rendszer (A) ζ - potenciál, (B) turbiditás és hidrodinamikai átmérő értékei a $m_{\text{CTAB}} : m_{\text{M-HyA, monomer}}$ tömegarányok függvényében. A töltéskompenzálás előtt ($m_{\text{CTAB}}/m_{\text{HyA, monomer}} = 0,2$) és után ($m_{\text{CTAB}}/m_{\text{HyA, monomer}} = 0,95$) készített minták reprezentatív fotói (B) ($c_{\text{HyA}} = 0,2 \text{ mg/mL}$, $c_{\text{CTAB}} = 0,0\text{-}0,26 \text{ mg/mL}$, PBS közeg).....	74
35. ábra: (A) Alacsony koncentrációjú (0,05-1,0 mg/mL) M-HyA oldatok nyírófeszültségének és (B) a nagyobb koncentrációjú (2-50 mg/mL) oldatok/gélek viszkozitásának változása a nyírósebesség függvényében	76
36. ábra: M-HyA hidrogélek (A) nyírási deformáció és (B) koncentráció függvényében meghatározott viszkoelasztikus paraméterei (A: tárolási modulus (G'), veszteségi modulus (G''); B: folyási pont, illetve fáziseltolódás a kezdeti G' és G'' értékek alapján).....	77
37. ábra: CTAB -dal neutralizált M-HyA gélek amplitúdó sepréses oszcillációs módszerrel meghatározott reológiai paraméterei (A: kezdeti tárolási (G') és veszteségi (G'') modulus; B: folyási pont és fáziseltolódás) ($c_{\text{HyA}} = 50 \text{ mg/mL}$)	78
38. ábra: Térhálósított HyA gélek amplitúdó sepréses oszcillációs módszerrel meghatározott reológiai paraméterei (A: kezdeti tárolási (G') és veszteségi (G'') modulus; B: folyási pont és fáziseltolódás).....	79
39. ábra: (A) A KP-tartalmú térhálósított- és (B) CTAB -dal neutralizált M-HyA hordozókból a KP kioldódási görbéi (pontokkal) és a mérési pontokra Weibull kinetikai	

modellel illesztett görbék (szaggatott vonal) ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7,4$, $0,9\text{ w/w\% NaCl}$, PBS közeg)	80
40. ábra: (A) A M-Chit-nal titrált H-HyA áramlási potenciál görbéi különböző ecetsavas közegben ($V_{\text{HyA, titrálandó}} = 10\text{ mL}$, $c_{\text{HyA, titrálandó}} = 0,045\text{ mg/mL}$, $c_{\text{Chit}} = 0,091\text{ mg/mL}$) és (B) a poliszacharidok koncentrációeloszlás görbéi ($c_{\text{HyA}} = 0,040\text{ mg/mL}$, $c_{\text{Chit}} = 9,0\text{ }\mu\text{g/mL}$). Az eloszlás görbéken szereplő szimbólumok az adott ecetsavas közeg pH értékét mutatják (●: $2,00\text{ V/V\%}$; ■: $1,00\text{ V/V\%}$; ◆: $0,727\text{ V/V\%}$; ▲: $0,500\text{ V/V\%}$)	82
41. ábra: (A) A M-Chit - H-HyA rendszer látszólagos viszkozitásának változása a $n_{\text{Chit}}/n_{\text{HyA}}$ monomer arány és az ecetsav koncentráció függvényében ($V_{\text{HyA, titrálandó}} = 19\text{ mL}$, $c_{\text{HyA, titrálandó}} = 0,1\text{ mg/mL}$, $c_{\text{Chit, titráló}} = 2\text{ mg/mL}$) és (B) a H-HyA áramlási potenciáljának változása $\text{pH} \approx 4,5$ ecetsav-acetát pufferes közegben (H-HyA: $c = 0,045\text{ mg/mL}$, M-Chit: $c = 0,091\text{ mg/mL}$)	83
42. ábra: A M-Chit, a H-HyA és a különböző tömegarányok mellett készített és liofilizált H-HyA/M-Chit komplexek FT-IR spektrumainak megfelelő részletei ($V_{\text{össz}} = 10\text{ mL}$, $c_{\text{HyA, törzs}} = 2\text{ mg/mL}$, $c_{\text{Chit, törzs}} = 2\text{ mg/mL}$, $c_{\text{ecetsav}} = 1\text{ (v/v)\%}$)	84
43. ábra: A HyA, Chit és a különböző tömegarányok mellett elkészített és liofilizált HyA-Chit komplexek (A) TG, (B) DTG és (C) DSC görbéi ($V_{\text{össz}} = 10\text{ mL}$, $c_{\text{HyA, törzs}} = 2\text{ mg/mL}$, $c_{\text{Chit, törzs}} = 2\text{ mg/mL}$, $c_{\text{ecetsav}} = 1\text{ (v/v)\%}$)	85
44. ábra: A három különböző típusú Chit/HyA hordozó előállításának és a lehetségesen képződő részecskék szerkezetének sematikus ábrázolása	87
45. ábra: (A) Chit/HyA I. ($m_{\text{Chit}}/m_{\text{HyA}} = 0,125-1,00$: $c_{\text{Chit}} = 0,091\text{ mg/mL}$, $V_{\text{Chit}} = 0,5-4,0\text{ mL}$, $c_{\text{HyA}} = 0,042\text{ mg/mL}$, $V_{\text{HyA}} = 8,72\text{ mL}$; $m_{\text{Chit}}/m_{\text{HyA}} = 4-80$: $c_{\text{Chit}} = 0,364\text{ mg/mL}$, $V_{\text{Chit}} = 4,0\text{ mL}$, $c_{\text{HyA}} = 0,134-0,0067\text{ mg/mL}$, $V_{\text{HyA}} = 2,72\text{ mL}$; HyA: Milli-Q vizes közeg, Chit: $\text{pH} \approx 4,5$), illetve (B) Chit/HyA II. és III. részecskék hidrodinamikai átmérőjének változása a Chit:HyA tömegarány függvényében ($c_{\text{Chit}} = 0,30\text{ mg/mL}$, $c_{\text{TPP}} = 0,15\text{ mg/mL}$, $c_{\text{HyA}} = 3,9-31\text{ }\mu\text{g/mL}$; Chit/HyA II: $V_{\text{össz}} = 4,73\text{ mL}$, Chit/HyA III: $V_{\text{össz}} = 4\text{ mL}$)	88
M46. ábra: Hatóanyag nélküli és hatóanyag-tartalmú (A) PLGA65, (B) PLGA75 és (C) PLA méreteloszlási görbéi (szerves fázis: $c_{\text{PLA/PLGA}} = 10\text{ mg/mL}$, $V = 1,5\text{ mL}$; vizes fázis: $C_{\text{PLUR}} = 0,1\text{ mg/mL}$, $V = 15\text{ mL}$; $m_{\text{hatóanyag}} = 7,5\text{ mg}$)	106
M47. ábra: (A) D- α -tokoferol-polietilén-glikol-1000-szukcinát, (B) ketoprofen és (C) (\pm)- α -tokoferol hatóanyagok UV-Vis spektrofotometriás módszerrel meghatározott kalibrációs spektrumai nagytisztaságú Milli-Q vizes közegben és a hozzájuk tartozó kalibrációs egyenesek	107

M48. ábra: (A) TP-nélküli és (B) TP-tartalmú PLGA65 részecskék FT-IR spektrumai (szerves fázis: $c_{PLA} = 10 \text{ mg/mL}$, $c_{TP} = 2,5 \text{ mg/mL}$; vizes fázis: $c_{PLUR} = 0,1 \text{ mg/mL}$).....	108
M49. ábra: A TP UV spektrumai és a meghatározott kalibrációs egyenes PBS közegben ($\text{pH} = 7,4$; $0,9 \text{ \% NaCl}$; $c_{PLUR} = 1 \text{ mg/mL}$).....	108
M50. ábra: A KP UV-Vis spektrofotometriás módszerrel meghatározott kalibrációs egyenese PBS közegben ($\text{pH} = 7,4$; $0,9 \text{ \% NaCl}$, $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$)	108
1. táblázat: A PLA alapú, TP-tartalmú kolloid részecskék előállításához használt komponensek koncentráció és térfogat adatai	33
2. táblázat: A DSC és a DLS mérésekkel meghatározott üvegesedési hőmérséklet ($T_{g,\text{max}}$), degradációs hőmérséklet ($T_{d,\text{max}}$), átlagos molekulatömeg és második viriál együttható értékek a szintetizált, illetve a kereskedelmi forgalomban kapható PLA/PLGA esetén	47
3. táblázat: Nanoprecipitációs eljárással előállított PLA/PLGA részecskék DLS módszerrel meghatározott hidrodinamikai átmérő (d_{DLS}) és polidiszperzitási index (PI) értékei.....	50
4. táblázat: A PLUR -stabilizált hatóanyag-tartalmú PLA /PLGA részecskék átlagos részecske átmérői, a polidiszperzitási indexek és a kapszulázási hatékonyságok.....	53
5. táblázat: Nanoprecipitációval előállított TP-tartalmú PLA részecskék átlagos részecske átmérő értékei, a polidiszperzitási indexek (PI), valamint a EE(%) és DL(%) értékek az alkalmazott kezdeti koncentrációk esetében.....	56
6. táblázat: A szakirodalomban jelenleg megtalálható, különböző módszerekkel előállított TP-tartalmú polimer alapú hordozó részecskék átlagos méretei, a ζ -potenciál, az EE(%) és DL(%) értékek a forrásközlemények megjelölésével.....	60
7. táblázat: PLGA50 alapú TP-nélküli és TP-tartalmú folyamatos áramlásos technikával előállított részecskék DLS módszerrel meghatározott hidrodinamikai átmérője és polidiszperzitási index értékei különböző áramlási paraméterek függvényében	61
8. táblázat: A TP -tartalmú PLA/PLGA alapú hordozó rendszerek kioldódási görbéire illesztett kinetikai modellek (12-14. egyenlet) megfelelő paraméterei	67
9. táblázat: A különböző koncentrációjú M-HyA/CTAB oldatok viszkozitás és nyírófeszültség görbéire illesztett Bingham és Carreau-Yasuda modellekből meghatározott plasztikus viszkozitás (η_{pl}), Bingham-féle folyáshatár (τ_{B}), nulla- nyírási viszkozitás (η_0) és végtelen-nyírási viszkozitás (η_{∞}) értékek	76
10. táblázat: A KP-tartalmú térhálósított és CTAB -dal neutralizált M-HyA rendszerek kioldódási görbéire illesztett kinetikai modellek (12-14. egyenlet) megfelelő paraméterei.....	81

1. Bevezetés

Széleskörű felhasználhatóságuknak köszönhetően a nanoszerkezetű anyagok tanulmányozása a modernkori kolloidkémia egyik dinamikusan fejlődő kutatási területévé vált. A nanoszerkezetű anyagok közül is egyre nagyobb teret hódítanak a különböző hatóanyag-szállító rendszerek, mivel alkalmazásukkal meghosszabbíthatjuk és fokozhatjuk egyes gyógyszerek hatékonyságát, továbbá lehetőség nyílik olyan terápiás vegyületek szervezetbe vitelére is, amelyek célzott helyre juttatását jelentősen nehezíti az adott hatóanyag specifikus tulajdonsága (pl.: hidrofilitás, töltés, degradáció). A nanoszerkezetű anyagok hordozóként való alkalmazhatóságának feltétele, hogy nagymértékű stabilitással rendelkezzenek, illetve méretük a 100-200 nm tartományt ne haladja meg. Számos szervetlen és szerves alapú hatóanyag szállító nanorészecske ismert. Ezek közül kiemelkedő szerepet töltenek be a különböző polimerek, melyet megerősít a *polimer alapú hordozó nanorészecskék* témakörében megjelent publikációk számának évről évre történő rohamos emelkedése is (1. ábra).



1. ábra: A „polimer alapú hordozó nanorészecskék” témában megjelent publikációk számának változása 1996-2019 között 5281db publikáció alapján¹

A polimerek hatalmas családján belül, biokompatibilitásuk és könnyű kezelhetőségük eredményeként, kitüntetett szerep jut az *un.* biopolimereknek (pl: polikaprolakton (PCL), poli(tejsav) (PLA), poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA)) és poliszacharidoknak (pl: hialuronsav, kitozán) főként orvosbiológiai és nanomedicina területeken (gyógyszer)hatóanyag hordozóként történő lehetséges alkalmazásuk következtében. A

¹ A publikációk számának eloszlását a Clarivate Analytics Web of Science tudományometriai adatbázis segítségével a „polymer carrier nanoparticle” kifejezés esetében határoztuk meg.

biopolimerek/poliszacharidok szerkezeti módosítása (kopolimerizáció, neutralizáció, keresztkötés stb.) révén szisztematikusan változtathatjuk hidrofilítási tulajdonságukat, ami megkönnyítheti a hatóanyagok polimer részecskébe való juttatását. A biopolimer/poliszacharid alapú részecskék szintézisére szolgáló technikák széles választékának köszönhetően, figyelembe véve a felhasználási területet és a gyógyszer vegyületek tulajdonságát, napjainkban már különböző, a hatóanyagokra formált hordozó részecskéket állíthatunk elő, amelyek szerkezetét és kapszulázási hatékonyságát a szintézisek során beállított paraméterek változtatásával optimalizálni tudjuk.

A nanoszerkezetű hatóanyag hordozó rendszerekkel kapcsolatos kutatások mind hazai, mind nemzetközi szinten egyre nagyobb jelentőséggel bírnak. Mindezeket figyelembe véve doktori munkám legfőbb célja volt, hogy kutatási eredményeinkkel átfogó információt nyújtsunk néhány biopolimer/poliszacharid alapú nanoszerkezetű hatóanyag szállító rendszer reproduktív módon történő előállítását befolyásoló tényezőjéről, melyek döntő hatással bírnak az előállított hatóanyag hordozó kolloid részecskék méretére, szerkezetére, összetételére, a kapszulázási hatékonyságra és a hatóanyag szabályozott úton történő leadására vonatkozóan.

2. Irodalmi áttekintés

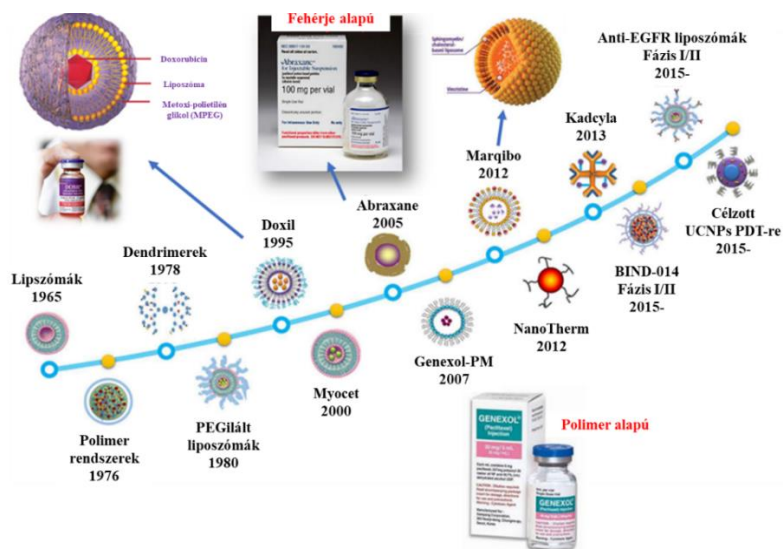
2.1. Kolloid részecskék, mint gyógyszerhatóanyag hordozók

Akár kisebb megfázás kezelésére alkalmazott gyógyszerről, akár súlyosabb daganatos megbetegedésnél felhasznált terápiás szerekről beszélünk, a gyógyszerkészítmények szervezetbe vitelére mindig is kitüntetett figyelem fordult. A hétköznapi életben leggyakrabban különböző tabletta, kapszula, injekció/csepp vagy kenőcs alapú „klasszikus” gyógyszer formulákkal találkozhatunk, melyek előállítása és gyártása a modernkori gyógyszeriparban viszonylag könnyen kivitelezhető. Fontos kiemelni, hogy a hatóanyagok ilyen formában való alkalmazásakor esetenként csak rövidtávú és kontrol nélküli felszabadulás érhető el, ami az egyes betegségek kezelésénél csak sűrűbb adagolással és magasabb dózissal korrigálható időnként súlyos mellékhatásokat eredményezve. A gyógyszerkészítmények elnyújtott hatásulásának és célzott helyre juttatásának érdekében a 21. századi gyógyszeripari kutatások egyik fő ágát képezi új típusú mikro- és nanoszerkezetű hatóanyag hordozó rendszerek tervezése és fejlesztése. Ennek legfőbb oka, hogy a gyógyszerkészítmények „kapszulázása” révén késleltetett, szabályozott és lokalizált hatóanyagleadást érhetünk el. Hatóanyag hordozó részecskék esetében akkor beszélhetünk nanométeres mérettartományról, ha azok mérete az 1-100 nm tartományban van [1]. Ettől eltérően, a szervezetben lévő mikropillák átlagos átmérőjének megfelelően a nanorészecskék orvosi felhasználhatósága már 200 nm alatti átmérőknél is megvalósítható [2]. A részecskék hatékonysága és célzott helyre juttatása szerkezetük (pl. alak, felület) és az összetételük módosításával befolyásolható és javítható [3], ami a hagyományos gyógyszer kapszulázási módszerekhez képest nagy előnyt jelent.

A liposzómális hordozórendszerek megismerésétől kezdve napjainkig számos, már kereskedelemben is kapható (pl. a doxorubicin-tartalmú liposzómális Doxil [4], a fehérje alapú Abraxane [5], a polimer alapú Genexol- PM [6]) és számos klinikai fejlesztés és tesztelés alatt álló (pl. rákos daganatok elleni antitestet tartalmazó (Anti-EGFR: anti epidermális növekedési faktor receptor) liposzómák [7], felkonvertáló nanorészecskék (UCNPs) fotodinamikai terápiára (PDT)[8]) hatóanyag-tartalmú termék ismert, ahogyan azt a **2. ábra** is összefoglalja. Mindezek megerősítik, hogy korszerű, új típusú hordozó rendszerek fejlesztésére irányuló kutatásokra folyamatos igény van.

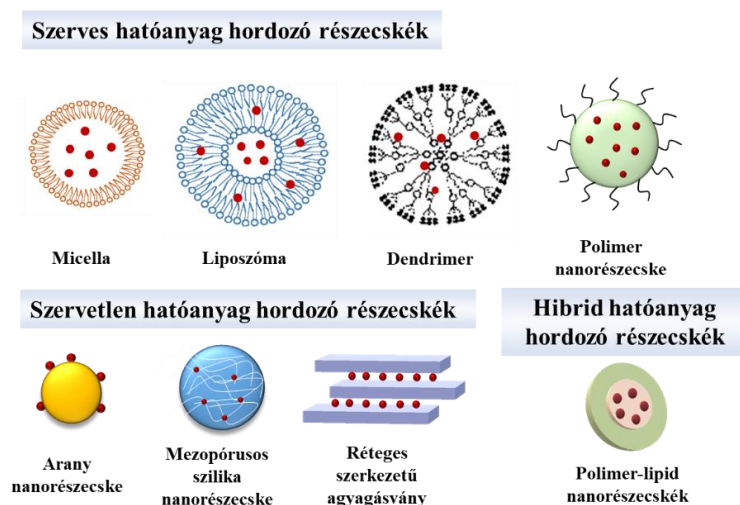
Napjainkban a hatóanyag hordozókat a fehérjéktől kezdve az agyagásványokig sokféle anyagtypusból előállíthatjuk. Ennek rendszerezése érdekében a hordozókat döntően három fő csoportba sorolhatjuk: szervetlen, szerves (pl. liposzóma, szilárd lipid, dendrimerek,

micellák, polimer) és hibrid (pl. fehérje-polimer hibrid, kerámia-polimer hibrid) rendszerek (3. ábra).



2. ábra: A nanoszerkezetű hatóanyag hordozót-tartalmazó termékek fejlődése a liposzómális hordozórendszerek megismerésétől napjainkig [9]

Szervetlen hordozóként széles körben alkalmaznak különböző arany [10,11], mágneses [12], mezopórusos szilika [13] mikro-, illetve nanorészecskéket vagy éppen réteges szerkezetű agyagásvány (pl. réteges kettős hidroxidok (layered double hydroxide: LDH)) nanoszerkezeteket stb. [14]. A szervetlen alapú rendszerek előnye, hogy a méret és a szerkezet változtatásával a részecskék mágneses és optikai tulajdonságai szabályozhatóak, így a hatóanyag szállításán kívül a képalkotásban, sejtek jelölésben vagy diagnosztikában egyaránt kiemelkedő szerepet tölthetnek be [15].



3. ábra: Hatóanyag hordozóként alkalmazható rendszerek sematikus ábrái

Kutatócsoportunk korábbi munkájában mezopórusos szilika alapú hordozókat állítottak elő és alkalmazták azokat eredményesen nem-szteroid gyulladáscsökkentő ibuprofen (IBU) kapszulázására [16]. A hatóanyag visszatartás növelése érdekében, a koloidális részecskéken ($d \sim 400$ nm) sikeresen alakítottak ki többrétegű héjként polietilénimin (PEI) és nátrium-polisztirol-szulfonát (PSS) polimer rétegeket és a hatóanyag felszabadulást tanulmányozták a kialakított héjak függvényében. A szilika részecskék mellett 2017-ben a Kutatócsoportunk Deák Ágota munkája révén sikeresen szintetizált Mg/Al réteges kettős hidroxidot (Mg/Al LDH), melynek szerkezetét széleskörűen jellemezte (fajlagos felület $114,96 \pm 0,48$ m²/g, felületi töltés (+ 0,641 meq/g), lamella távolság stb.), majd neuroaktív hatású kinurénsav (KYNA) interkalálását valósította meg egyszerű ioncserés eljárással. Az előállított LDH/KYNA réteges szerkező kompozit összetételének, szerkezetének, hatóanyag-tartalmának meghatározása mellett (120 mg KYNA/g LDH) a hatóanyag kioldódását is eredményesen tanulmányozta mesterséges gyomorsav közegben, ugyanis a vizsgált molekula ígéretes hatásokat fejthet ki a gyomorfekély kezelésében. Igazolta, hogy az interkalálás révén a hatóanyag felszabadulása kb. 25-30%-kal lassabban történik meg, mint ahogy az a hordozó nélkül figyelhető meg vizsgált 6 órás intervallumban [17].

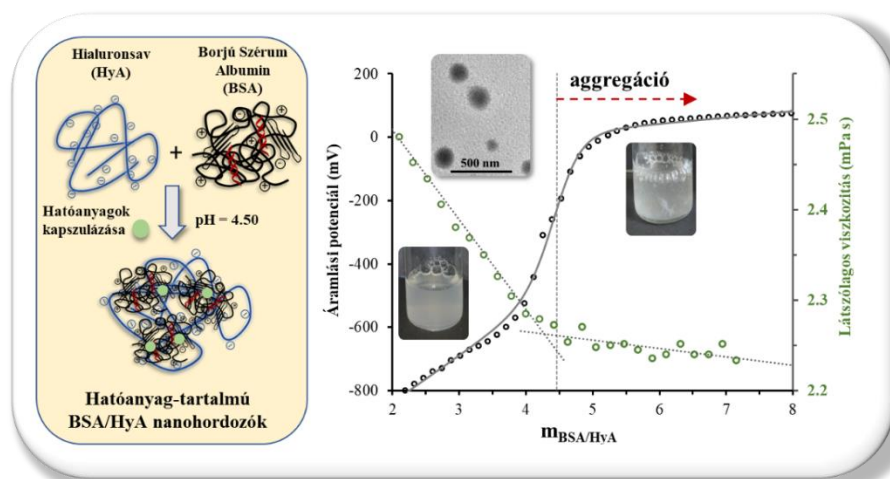
A szervetlen alapú hordozók mellett alacsony toxicitásuknak köszönhetően gyakran alkalmaznak asszociációs kolloidokat, dendrimereket, fehérjéket vagy különféle polimereket hatóanyag szállító kolloid rendszerek alapjául. Ezek előállítására és vizsgálatára irányuló kutatások központi szerepet töltenek be a modernkori nanomedicina területén.

Az asszociációs kolloidokon belül a nioszómális és a liposzómális rendszerek a legelterjedtebbek. A nioszómáknál nem-ionos tenzidekből, míg liposzómáknál foszfolipidekből felépülő unilamellás (egy kettősrétegből felépülő) vagy multilamellás (több kettős rétegből felépülő) vezikulákról beszélünk, melyek mind hidrofíl, mind lipofíl hatóanyagok szállítására felhasználhatóak [18,19].

A dendrimerek gömb alakú, elágazó láncú makromolekulák, melyek központjában egy magmolekula áll, amihez különböző polimer láncok/terminális aktív csoportok kapcsolódnak. A kiindulási maghoz adott elágazási szintekkel egy több generációs régiókból álló összetett rendszer képződik, ahol az elágazó láncok funkcionálizálhatóak. A hatóanyag az előállítási folyamat megfelelő kiválasztásával a dendrimer mag közelében vagy a felsőbb elágazási szinteken is megkötődhet [20,21].

A szerves hordozók egyik nagy csoportját a fehérje alapú nanorészecskék jelentik [22]. Kutatócsoportunkban korábban sikeresen igazolták, hogy a neuroaktív KYNA vér-agy gáton

való transzportja marha szérum albumin (BSA) alapú kompozit révén sikeresen megvalósítható [23]. A kutatómunka eredményéből elfogadott magyar² (2015) és nemzetközi (2020) szabadalom is született. Ezen munkához kapcsolódva sikeresen kiviteleztek elsőként az irodalomban a fenti mag-héj szerkezetű részecskék előállítását áramló rendszerben is - ezen munkában már én is tevékenyen részt vettem - ahol a reaktsók arányának, áramlási sebességének és a nyomásnak a hatását tanulmányoztuk az optimális mag-héj struktúra kialakulásához [24]. Igazoltuk, hogy ezen technikával költséghatékonyan, rövidebb idő alatt és nagyobb mennyiségben is előállíthatunk a klasszikus preparatív technikához képest 15-20%-kal kisebb és monodiszperzebb BSA alapú KYNA-tartalmú, vagy ezen hatóanyaghoz hasonló szerkezetű és oldékonyságú molekulákat tartalmazó kolloid részecskéket. Sikeresen állítottunk elő továbbá mag-héj szerkezetű BSA/hialuronsav (HyA) komplex kolloid részecskéket is, melyek átlagosan 210-240 nm átlagos átmérővel rendelkeznek [25]. Ahogyan a kutatómunkából megjelent közlemény grafikus absztraktja is mutatja a **4. ábra** formájában, a kompozit képződése csak adott BSA/HyA tömegarány alkalmazása esetén valósul meg. A kompozit előállításához hozzájárulva az irodalomban elsőként tanulmányoztuk kvantitatívan a nevezett két makromolekula kölcsönhatását számos mérés technika felhasználásával. Ezen munka eredményei nem képezték doktori értekezésem alapját, így ezeket nem mutatjuk be részletesen.



4. ábra: BSA/HyA komplex kolloid részecskék előállításának sematikus ábrája (bal oldal) és a képződő kolloid részecskék szerkezeti tanulmányozásának eredményei az alkalmazott m_{BSA}/m_{HyA} tömegarány függvényében (jobb oldal) [25]

² Dékány I., Vécsei L., Varga N., Toldi J., Majláth Zs., Krizbai I., *Hatóanyagoknak a központi idegrendszerben történő szabályozott leadására alkalmas nanokompozit, eljárás annak előállítására és alkalmazása*, **2015**, Bejelentés ügyszáma: P1500356

A disszertációm alapját képező polimer alapú hordozó rendszereket a következő alfejezetekben mutatom be részletesen.

2.2. Makromolekulás (polimer alapú) hatóanyag hordozók

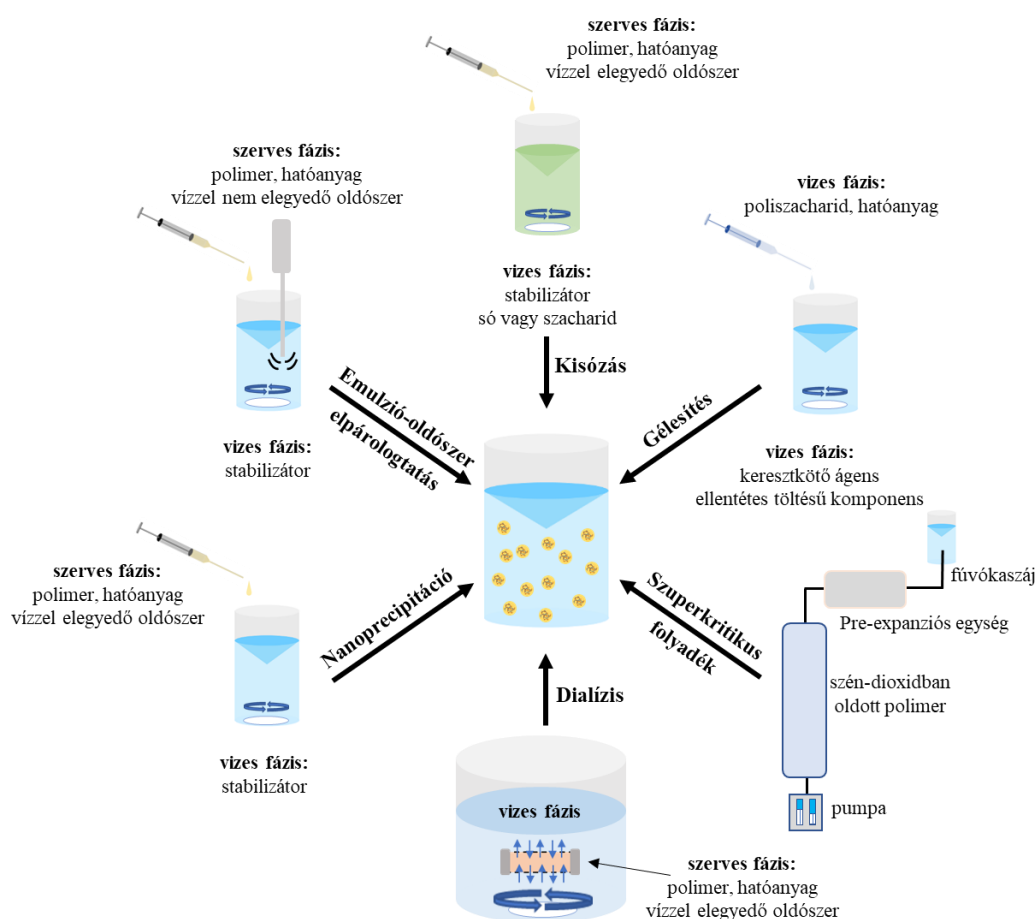
2.2.1. Polimer alapú nanorészecskék jellemzése

A hatóanyagok kapszulázására felhasználható hordozók egyik nagy családját a polimer alapú részecskék alkotják, melyek előállítására biokompatibilis és nem toxikus makromolekulákat használnak. Ilyen makromolekulák lehetnek természetes eredetűek (úgy mint a kitozán, alginát, zselatin stb.) vagy szintetikus előállított származékok (pl. poli(tejsav), polikaprolakton, polietilén-glikol (PEG), poli(*N*-izopropil-akrilamid) (PNIPAM)) [1,26–28]. Felhasználásuk legfontosabb feltétele, hogy a szervezetbe juttatáskor és a hatóanyag felszabadulásakor lejátszódó polimer degradáció olyan monomer végterméke(ke)t eredményezzen, melyet a humán szervezetben lejátszódó anyagcsere folyamatok le tudnak bontani [29]. A polimer alapú hordozóknál a hatóanyag egyaránt elhelyezkedhet a részecskék felületén, a részecskékben egyenletesen elosztatva vagy egy központi magban csoportosulva. Ennek függvényében a részecskék szerkezete alapján megkülönböztethetünk nanokapszulákat és nanogömböket. Nanokapszuláknál a hatóanyag magokat egy polimer héj borítja, míg a nanogömböknél a hatóanyag a polimer mátrixban homogénen oszlik el [27]. Ezeknek a struktúráknak a kialakulását a részecskék előállításához használt módszerekkel és a kezdeti paraméterekkel szabályozhatjuk.

Kiváló biokompatibilitásuknak köszönhetően a polimer részecskéket egyaránt alkalmazzák rákellenes vegyületek [30], vakcinák [31], vitaminok [32] vagy fogamzásgátló hormonok [33] kapszulázására. A rákellenes hatóanyagként alkalmazható doxorubicin polimer hordozókba (pl. doxorubicin-PLGA konjugátum, kitozán (Chit)) kapszulázásával kapcsolatban számos publikáció megtalálható a szakirodalom [34–38], mivel lipofil tulajdonsága miatt közvetlen alkalmazása korlátozott. A polimer alapú nanorészecskék jól beilleszthetőek, egyéb orvosi biológiai irányú gyógyszerfelszabadulással kapcsolatos kutatásba, úgy mint a szövettechnikában [39,40], mivel a hordozókba kapszulázott gének és hatóanyagok serkenthetik a szövetek növekedését és a beépülését a szervezetbe. Napjainkban a kutatók egyre nagyobb figyelmet fordítanak a különböző ingerre érzékeny (pl. pH, hőmérséklet) polimer hibrid (smart) részecskék előállítására [41]. A pH változására érzékeny nanorészecskéknél előszeretettel alkalmaznak PEG bevonatokat [42]. Ebben az esetben a pH csökkenésekor a védő polimer réteg leválk a részecskék felületéről, mellyel csökken vagy teljesen megszűnik a hatóanyag visszatartó hatás.

2.2.2. Polimer alapú nanorészecskék előállítási lehetőségei

A makromolekuláris kolloidokból felépülő nanorészecskék előállítására a szakirodalomban már számos technikát olvashatunk. A módszerek csoportosítása szerint a részecskéket előállíthatjuk monomeregységekből polimerizációval vagy polireakciókkal, illetve már kereskedelmi forgalomban kapható szintetizált polimerekből kiindulva. Monomeregységekből leggyakrabban (mini-, mikro-, stabilizátor nélküli) emulziós és un. határfelületen lejátszódó polimerizációval képeznek nanorészecskéket [43], míg kész, már rendelkezésre álló polimereknél az emulziós, nanoprecipitációs, gélesedési, „kisózásos”, dialízis, és szuperkritikus technikák az elterjedtek, melyeket az **5. ábra** foglal össze [44,45]. Doktori disszertációm során a nanorészecskék előállításához főként a laboratóriumunkban szintetizált és néhány a kereskedelmi forgalomban kapható makromolekulákat alkalmaztuk, így a továbbiakban az utóbb említett technikákat mutatjuk be részletesen.



5. ábra: Polimer alapú hordozó rendszerek előállítási lehetőségei makromolekulákból

A polimer alapú nanorészecskék előállítására kidolgozott első technika az emulziós-oldószer elpárolgztatásos eljárás volt [46]. A módszernél főként olaj a vízben (O/V)

emulziós rendszert használnak, ahol a polimereket vízzel nem elegyedő illékony oldószerben, leggyakrabban diklórmetánban, kloroformban, vagy etil-acetátban, oldják, majd az oldatot vizes közegben diszpergálják. Az emulziók kialakításához nagy fordulatszámú kevertetés és/vagy ultrahangos szonikálás szükséges [47], illetve a rendszer stabilitásának megtartásához a vizes közegben különböző stabilizátort alkalmaznak (pl. polivinil-alkohol (PVA), kationos vagy anionos felületaktív anyag stb.) [48]. Az emulziós cseppeket alkotó szerves oldószer elpárolgásának következtében egy polimer alapú nanorészecske szuszpenzió képződik.

Az oldószer elpárolgotatásos technikát felhasználva víz/olaj/víz (V/O/V) duplaemulziós rendszerek is előállíthatóak, ahol az emulziós csepp belső vizes fázisú magjában hidrofil tulajdonságú gyógyszerkészítmények kapszulázása is megvalósítható [49,50]. Ennek az eljárásnak az alapja, hogy a hatóanyag-tartalmú vizes fázisból és a polimer-tartalmú szerves fázisból egy víz/olaj (V/O) emulziót készítenek, amit egy stabilizátort tartalmazó vizes fázisban (V/O/V) emulgeálnak. A szerves oldószer elpárolgotatásával hidrofil hatóanyagot tartalmazó polimer nanorészecskék képződnek. Az emulziós módszerek hátránya, hogy a felhasznált szerves oldószer mind a környezetre, mind az élő szervezetre káros hatással vannak.

Az emulziós eljárás egyik módosított formája az ún. „kisózáson” alapuló technika, ahol egy, a vízzel jól elegyedő szerves oldószer felhasználva O/V emulzió állítható elő vizes fázisban lévő elektrolitok segítségével [51]. Ilyen soként gyakran alkalmaznak pl. magnézium-kloridot vagy kalcium-kloridot. A kialakuló emulziós rendszerhez vizet adagolva a só koncentráció csökken és a szerves oldószer kiáramlik a vizes közegbe. Ennek következtében az emulziós cseppekben lévő polimer precipitálódik és részecskéket képez.

A kutatómunkánk során is használt nanoprecipitációs módszer a polimer alapú hordozó rendszerek előállítására egy könnyen kivitelezhető technika. Az eljárást elsőként H. Fessi és munkatársai alkalmazták nem-szteroid gyulladáscsökkentő (nonsteroidal anti-inflammatory drug: NSAID) indometacin-tartalmú PLA nanokapszulák preparálásához [52]. A nanoprecipitáció, más néven oldószer kiszorításos, technikánál a vizsgálni kívánt hidrofób polimert és ideális esetben a hatóanyagot egy vízzel jól elegyedő szerves oldószerben feloldják és az elkészített oldatot egy stabilizátor-tartalmú vizes közegbe csepegtetik [44,53,54]. Ahogy a szerves oldószer elpárolog, a polimer kicsapódik a vizes közegben, ami részecskék képződését eredményezi. A polimer nanorészecskék kialakulása az oldószer kicserélésekor a vizes és szerves fázis felületén kialakuló határfelületi turbulenciához köthető [45,54,55]. Ennek köszönhetően a folyamatokat az ún. Marangoni effektus

szabályozza. A vizes fázishoz adagolt polimer-tartalmú szerves fázisról nanoméretű cseppek szakadnak le, amiket a jelenlévő felületaktív anyag addig stabilizál, míg a szerves fázis gyors diffúziója és a polimer kicsapódása le nem játszódik. Szerves oldószerként gyakran alkalmaznak acetont, etanolt, dioxánt, dimetil-szulfoxidot *stb.*, mivel nagyon jól elegyednek vízzel és az emulziós eljáráshoz képest kevésbé toxikusak a környezetre.

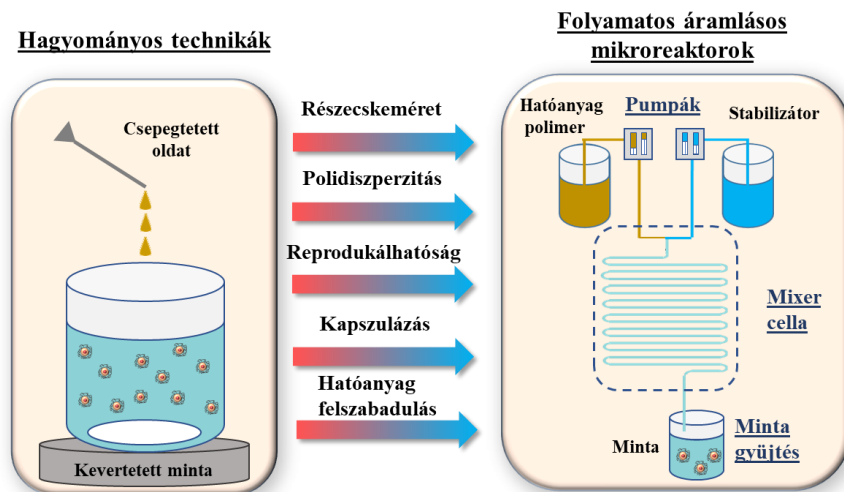
A részecskék előállítására jól alkalmazhatóak a dialízis és a szuperkritikus folyadék eljárások is. A dialízis technikánál a polimer oldatot egy megfelelő pórusméretű membránba/dialízis csőbe helyezik, amit egy, a polimer oldat közegével jól elegyedő, oldószerbe (polimer szempontjából kicsapószerbe) helyeznek [56,57]. A dialízis során a membrán belül lévő oldószer kicserélődik és részecskék képződése mellett a polimer kicsapódik. A szuperkritikus folyadékon alapuló módszerek közül a gyors expanziós eljárások (RESS: rapid expansion of supercritical solution, RESOLV: rapid expansion of supercritical solution into liquid solvent) a legelterjedtebbek [43,58]. A folyamatok során a makromolekulákat szuperkritikus folyadékban, főleg szén-dioxidban, feloldják és egy kapilláris fűvőkán keresztül levegőbe (RESS) vagy folyadékba (RESOLV) kiengedik, ahol az oldat kitágul. A hirtelen nyomáscsökkenéssel a polimerrel túltelített rendszerben részecskék képződnek.

Az előzőleg említett módszerek hátránya, hogy főleg hidrofób polimer nanorészecskék előállítására alkalmazhatóak, ezért a hidrofil polimereknél más technikák felhasználása szükséges. A hidrofil tulajdonságú poliszacharidokból (pl. hialuronsav, kitozán) elsőrendű vagy gyengébb másodrendű kölcsönhatásokon alapuló gélesedési módszerekkel lehet részecskéket készíteni [59]. A kémiai térhálósításon alapuló gélesítési technikánál a poliszacharid láncok között kovalens kötással keresztkötő ágenseket (pl. hialuronsav diaminnal történő keresztkötése [60]) rögzítenek. A kialakuló keresztkötött poliszacharid gombolyagokból megfelelő kezdeti paraméterek mellett nanorészecskék állíthatóak elő. A módszer hátránya, hogy a szintéziskor használt reagensok toxikusak lehetnek, így a felhasználásuk előtt a részecskéket mindig tisztítani kell. Az ionos gélesedési módszerek közül a polielektrolittal történő komplexképződésnél ezzel ellentétben nincs szükség reagensre a reverzibilis kölcsönhatások kialakítására. Ebben az esetben a felhasznált poliszacharidot a töltésének megfelelően semleges vagy enyhén savas közegben oldják, majd egy ellentétes töltésű komponenst (pl. felületaktív anyagot, ellentétes töltésű polimert/polielektrolitot) tartalmazó oldatba csepegtetik (**5. ábra**). A töltés kompenzálása során kialakuló komplex rendszerek nanorészecskék formájában kicsapódnak az oldatokban.

2.2.3. Polimer nanorészecskék előállítása folyamatos áramú, áramlásos kémiai mikroreaktorban

Az előző alfejezetben említett hagyományos és gyakorta alkalmazott polimer nanorészecske előállítási technikák nagyobb mintamennyiségek preparálására kevésbé alkalmasak, illetve költséghatékonyságukat nézve nem kifizetődőek. Ennek kiküszöbölésére az 1990-es évektől kezdve egyre elterjedtebben alkalmaznak különböző folyamatos áramú, áramlásos kémiai rendszereket [61], melyek felhasználásával könnyen szabályozható, reprodukálható és jól követhető előállítási módszerek fejleszthetők [62]. Az áramlási sebességek, a hőmérséklet, nyomás és egyéb fontos paraméter változtatásával a részecskék mérete és polidiszperzitása jelentős mértékben csökkenthető és szabályozható [63].

Az áramlási technikák közül a mikroreaktorokkal kapcsolatos kutatások az elmúlt pár évben a hatóanyag hordozó rendszerekkel kapcsolatos kutatások egy dinamikus fejlődő ágává nőtte ki magát [62], ahol a mikro- és nanorészecskék előállítása a korábban említett (pl. emulziós, nanoprecipitációs) módszerek áramlásos rendszerbe történő beintegrálásával valósítható meg. A mikroreaktorok felépítése szerint három fő részből épülnek fel: mintaadagoló pumpából, mixer cellából és mintagyűjtő részből (6. ábra).



6. ábra: Polimer részecskék előállítására alkalmazott hagyományos technika (bal oldal) és a folyamatos áramlásos mikroreaktor általános sematikus ábrája (jobb oldal)

A pumpák működésük során folyamatos áramlási sebességet biztosítva adagolják a szükséges mintamennyiséget a rendszerbe. Az alkalmazott mixer cellákat aktív és passzív csoportba sorolhatjuk [64]. Passzív celláknál a turbulens áramlási profil és a minták összekeverése a csatornák geometriájával, míg aktív celláknál külső behatással (pl.

hőmérséklet, nyomás) érhető el. Az előállítás közegét nézve megkülönböztethetünk egyfázisú (pl. precipitációs rendszerek [65]) és többfázisú (pl. emulziós rendszerek [66]) rendszereket is. A mikroreaktor alapú folyamatos áramlási technikák alkalmazását nehezíti, hogy az optimális paraméterek (pl. áramlási sebesség, áramlási sebesség arányok, kezdeti koncentráció) ismerete nélkül a hatóanyag-tartalmú nanorészecskék előállításakor a kapszulázás nem valósul meg és a cellák könnyen eltömődhetnek, így a kiindulási optimális koncentrációk előkísérletekben történő meghatározása döntő fontosságú.

2.3. PLA/PLGA és Hialuronsav alapú rendszerek jellemzése

2.3.1. PLA/PLGA alapú hatóanyag hordozó rendszerek

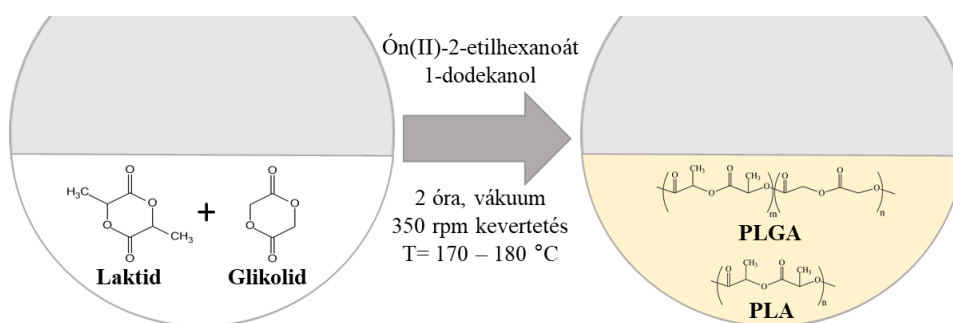
A PLA egy 2-hidroxi propionsav (tejsav) monomer egységekből felépülő, kiváló biokompatibilitással rendelkező alifás poliészter [67]. Biodegradábilis és komposztálható sajátságának köszönhetően az elmúlt évtizedekben az élelmiszer-csomagolás technikától a nanomedicináig minden területen megtalálható [68]. Elsőként Théophile-Jules Pelouze állított elő PLA polimert tejsav polikondenzációs reakciójával [69], míg Wallace Hume Carothers 1932 -ben fejlesztett ki egy olyan módszert, ahol a PLA-t laktidból (tejsav ciklikus dimerje) polimerizációs folyamatokkal állított elő [70]. Ezt később a DuPont amerikai vállalat 1954-ben szabadalmaztatta.

A PLA-t felépítő tejsav monomereket fermentációval (pl. cukornádból [71,72]) vagy kémiai szintézissel (pl. laktonitril erős savas hidrolízise [73]) is előállítható. A kémiai szintézisek hátránya, hogy a folyamatok során a tejsav L(+) és D(-) két sztereoizomerjének racém elegye képződik, míg a fermentációnál a baktériumtörzsek megfelelő kiválasztásával a sztereoizomerek külön is előállíthatóak [74]. A felhasználhatóság szempontjából a PLA amorf és kristályos jellege nagy szerepet bír, mivel stabilitása és termikus sajátsága jelentősen változhat a szerkezete függvényében. M. Pyda és munkatársai korábban már vizsgálták az amorf és a kristályos PLA hőkapacitását és megállapították, hogy a PLA kristályos szerkezete csak 90 % -nál nagyobb L-tejsav monomeregység mennyiség mellett érhető el [75]. A PLA-ban lévő L- és D- tejsav arányok függvényében a kialakuló kristályszerkezet α , β vagy γ formát vehet fel, melyek közül a legstabilabb az α forma [76].

A PLA polimer előnye, hogy a kopolimerizáció révén a degradációs, a biokompatibilitási és a hidrofilitási tulajdonságai szabályozhatóak. A PLA kopolimerjei közül a legelterjedtebb a glikolsav mellett előállított poli(tejsav-ko-glikolsav). A láncban lévő glikolsav mennyiségét növelve a hidrofilitása és degradációs sebessége is megnövelhető. Hidrolízise során tejsav és glikolsav monomeregységek képződnek, ami

metabolikus úton a Krebs-ciklus révén lebontható [77]. Ennek köszönhetően a PLGA kopolimerek minimális toxicitással rendelkeznek, így hatóanyag hordozó rendszerként való felhasználásukban nagy potenciál rejlik.

A PLA/PLGA polimereket a szintézis módszertől függően különböző molekulatömegek mellett is előállíthatjuk. A könnyebb átláthatóság érdekében és a polimerizációs/kopolimerizációs módszerek közötti hasonlóság miatt (kezdeti tiszta tejsav helyett tejsav-glikolsav keverék alkalmazása) a szintézis módszereket a PLA esetében mutatjuk be részletesen. A PLA szintézise számos polimerizációs folyamattal kivitelezhető, melyek közül a legismertebbek a (közvetlen, szilárd állapotú) kondenzációs polimerizációs (polikondenzációs), az azeotróp dehidratációs és a gyűrűfelnyitási polimerizációs (ROP) eljárások [74,78,79]. A nagy molekulatömegű PLA makromolekulák előállítására legtöbb esetben a ROP módszert alkalmazzák, ahol a polimert a tejsav ciklikus dimerjének gyűrűfelnyitásával állítják elő. A szintézis tömb és oldat fázisban is kivitelezhető, ahol egy katalizátor és iniciátor segítségével a laktid gyűrűk kinyílnak és összekapcsolódnak. A katalizátortól függően a polimerizáció anionos, kationos és koordinációs mechanizmus alapján is lejátszódhat [80]. Katalizátorként jól alkalmazható az ón(II)-2-etilhexanoát, az alumínium(III)-izopropoxid vagy a cink(II)-laktát stb., míg iniciátorként 1-dodekanolt alkalmaznak gyakorta. A PLA-n kívül ezen ROP technika a nagy molekulatömegű PLGA kopolimerek előállítására is kiválóan alkalmazható. Ebben az esetben a szintéziskor a laktid és a glikolsav ciklikus dimerjének (glikolid) megfelelő arányok melletti keverékét használják, ahogyan azt a **7. ábra** is szemlélteti.



7. ábra: PLA/PLGA makromolekulák gyűrűfelnyitási polimerizációval (ROP) történő szintézisének sematikus ábrája

Korábban C.D.C. Erbetta és munkatársai 50:50 (PLGA50) és 70:30 (PLGA70) laktid:glikolid arányok beállítása mellett már állított elő ROP eljárással PLGA kopolimereket [81]. Fourier-transzformációs infravörös (FT-IR) spektroszkópiás, mágneses

magrezonancia (NMR) spektroszkópiás, differenciális pásztázó kalorimetriás (DSC) és termogravimetriás (TG) módszereket felhasználva igazolták, hogy kopolimerizációs folyamatok sikeresen lejátszódtak és az előállított polimer minták visszamaradt monomer szennyezéstől mentesek. A.T.C.R Silva és munkatársai hasonló körülmények között $m_{\text{laktid}}:m_{\text{glikolid}} = 82:18$ aránynál elkészített PLGA degradációját tanulmányozták *in vitro* körülmények között különböző módszerek segítségével (FT-IR, DSC, TG, reológia, pásztázó elektronmikroszkóp (SEM)) [82].

A könnyen kivitelezhető előállítási technikáknak és viszonylag magas hatóanyag bevitelnek köszönhetően a PLA/PLGA nanorészecskék, illetve nanokapszulák előállításával kapcsolatban számos publikáció található a szakirodalomban [83]. Hidrofób hatóanyagok esetében főleg nanoprecipitációs, vagy emulziós eljárást alkalmaznak a leggyakrabban, míg hidrophil hatóanyagoknál a duplaemulziós vagy (megfelelő szerves fázis kiválasztása mellett) szintén a nanoprecipitációs technikát. Az előállítási és tisztítási eljárások során beállítható paraméterek változtatásával a részecskék stabilitása, mérete és szerkezete szabályozható. Ilyen befolyásoló hatása lehet például a kezdeti koncentrációknak, a hőmérsékletnek, az oldószereknek, vagy a felhasznált polimerek molekulatömegének [84]. A PLGA nanorészecskék előállításával kapcsolatos kutatások fő célja a hordozó rendszer adott hatóanyagokra való optimalizálása, ahol a vizsgálatok során beállított kezdeti paraméterek jelentősen eltérhetnek, ami megnehezíti az eredmények összevethetőségét.

A kutatómunkánk során a korábbi alfejezetben már részletezett nanoprecipitációs módszert alkalmaztuk PLA/PLGA alapú koloid részecskék előállítására [85,86], ahol a részecskék tulajdonságait (pl. méret, polidiszperzitás, ζ -potenciál stb.) szabályzó paraméterek megismerését célzó publikációkból számos olvasható a szakirodalomban. W. Huang és C. Zhang a nanoprecipitációs módszerrel előállított PLGA részecskék méretének szabályozhatóságát vizsgálták különböző paramétereken [87]. Eredményeikkel rámutattak arra, hogy a megfelelő szerves oldószer kiválasztásával, a polimer koncentráció és a vizes fázis ionerősségének csökkentésével, illetve a hőmérséklet növelésével a részecskék mérete csökkenthető. U. Bilati és munkatársai főként hidrophil hatóanyagok kapszulázására alkalmazható nanoprecipitációs eljárásnál a polimer oldószer, a kicsapószer, az oldószer arány és a polimerek koncentráció hatását vizsgálták [54]. A mérések jelentős részében kicsapószerként különböző alkoholokat használtak, ahol a beállított körülményektől függően 85-560 nm közötti részecskeméreteket kaptak. A részecske kicsapására használt közeget figyelembe véve azt tapasztalták, hogy azonos körülmények között a homológ sor szerint a metanol < etanol < propanol kicsapószer közegben a részecskék átmérője

folyamatosan nő (stabilizátor nélküli közegben ~ 102 nm -től (metanol) ~ 377 nm átmérőig (izopropanol)). R. Lancheros és munkatársai a már *N*-acetilcisztein-tartalmú PLGA50 (poli(laktid-ko-glikolid, laktid:glikolid arány 50:50) részecskék méretének és kapszulázási hatékonyságát jellemezték a pH, a koncentráció, az oldószer, az oldószerarányok és a molekulatömeg függvényében [88]. Az előállított részecskéken végzett dinamikus fényszórás (DLS) mérések igazolták, hogy a polimer molekulatömegének és koncentrációjának csökkentésével, míg a szerves:vizes oldószerarány növelésével és a Ca-só jelenlétével a részecskeméret 250 nm alá is csökkenthető. Az előbbi publikációkat összegezve jól látható a módszer sokszínűsége, ami megnehezíti a rendszert befolyásoló hatások széleskörű megismerését. Ennek köszönhető, hogy a részecskék méretét, szerkezetét és stabilitását nagymértékben szabályzó számos egyéb paraméter befolyásoló hatása még kevésbé ismert, ezért a rendszerek karakterizálásával kapcsolatos kutatások kiemelkedő fontosságúak.

A hatóanyag kapszulázását, a fent említett paraméterek mellett, a gyógyszerszármazékok és a polimerek hidrofilitása is befolyásolja. J. M. Baricello és munkatársai korábbi munkájuk során a hidrofil és hidrofób hatóanyagok kapszulázhatóságát vizsgálták PLGA75 (poli(laktid-ko-glikolid), laktid:glikolid arány 75:25) ($M_w = 10000$ Da)) és Pluronic F68 stabilizátor esetében [89]. A méréseikkel igazolták, hogy a nanoprecipitációs módszerrel előállított, átlagosan 160-170 nm átmérővel rendelkező, részecskéknél a lipofil hatóanyagok kapszulázása eredményesebb. Fontos megjegyezni, hogy a polimerek és hatóanyagok hidrofilitási sajátságainak a részecskék méretére, kapszulázási hatékonyságára és stabilitására gyakorolt együttes hatása kevésbé ismert. Mindezek mellett az előállítás során keletkezett részecskék szerkezetével (nanogömb vagy nanokapszula) a kioldódási folyamatok nagy mértékben megváltozhatnak [27], így ezek meghatározása is nagy jelentőséggel bír.

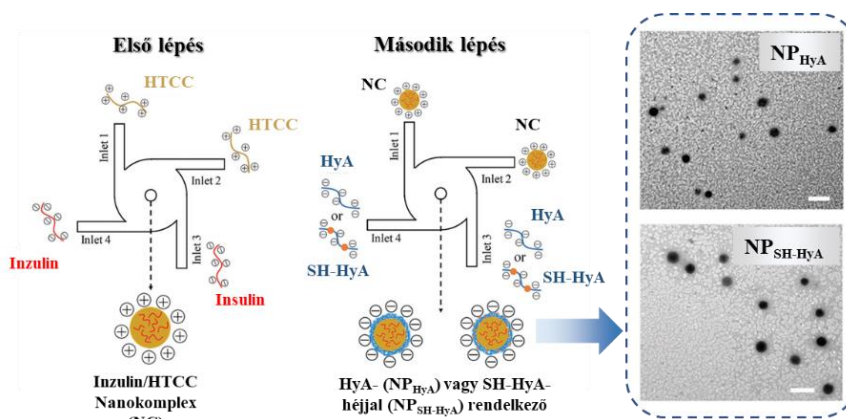
2.3.2. HyA alapú kolloid rendszerek

A hialuronsav egy β -(1 \rightarrow 4) kapcsolt *D*-glükuronsav és β -(1 \rightarrow 3) kapcsolt *N*-acetil-*D*-glükózamin egységekből álló, energetikailag stabil szerkezettel rendelkező mukopoliszacharid, melyet elsőként Karl Meyer és John Palmer fedezett fel a marhák szem üvegtestében [90]. A hialuronsav az extracelluláris mátrix egyik komponense, illetve minden emlőállatban megtalálható (pl kötőszövetekben, ízületi folyadékban) só formájában (hialuronát) [91].

Kiváló biokompatibilitásának és viszkozitási tulajdonságainak köszönhetően orvosbiológiai (pl. hatóanyagszállítás, szemészet) és kozmetikában egyaránt alkalmazzák [92–95]. A HyA alapú hidrogélek viszkozitásának tanulmányozására gyakran használnak reológiai méréseket. Ennek fontossága abban rejlik, hogy a molekulatömegtől, a koncentrációtól és a szerkezettől (pl. térhálósítás [96], neutralizálás [97]) a hidrogélek viszkozitási tulajdonsága jelentősen változhat, ami kiemelt szereppel bír akár hidratáló gélről akár ízületi folyadékként/ízületi fájdalmak kezelésére való felhasználásról beszélünk [90]. Alacsonyabb koncentrációjú HyA gélek pszeudoplasztikus viselkedést mutatnak, így magasabb nyírási sebességeknél a viszkozitásuk csökkenni kezd, ami előnyös a gélek injektálásánál [91]. Mindezek mellett a polimer láncok „feltekeredésének” eredményeként viszkoelasztikus viselkedés is megfigyelhető. Frekvencia sepréses oszcillációs reológiai mérésekkel igazolták, hogy magasabb frekvenciaértékeknél a HyA gélek Newtoni viselkedése elasztikusra vált [98]. Fontos megjegyezni, hogy a hordozó rendszerek vizsgálatánál releváns nagyon kis koncentrációjú HyA molekuláris oldataival kapcsolatban kevés információ található.

A HyA polimerlánc tengelyétől ekvatoriálisan elhelyezkedő hidroxil-, karboxil- és acetamidocsoportoknak köszönhetően a HyA hidrogénkötések kialakítására képes, aminek eredményeként kiemelkedő hidrofilitással és vízdékonysággal rendelkezik [99]. A láncokon lévő hidrogén atomok viszont kismértékben hidrofób jelleget adnak a polimernek, ezáltal a hialuronsav amfifil tulajdonsággal is rendelkezik. Ez a sajátossága teszi alkalmassá a hordozó nanorészecskék előállítására. A hialuronsav karboxilcsoportjának alacsony pK_a -ja ($pK_a \sim 2,9$ [100]) miatt fiziológiás körülmények között negatív töltéssel rendelkezik, ezáltal kationos komponenseket elektrosztatikus kölcsönhatások révén képes megkötni, mely hatóanyag hordozóként betöltött szerepét tovább erősíti.

A HyA negatív töltése révén elektrosztatikusan kötött héj szerkezet kialakítására is képes a hordozóként alkalmazni kívánt részecskék felületén. H. Tian és munkatársai ennek megfelelően alakított ki HyA héjat inzulin-tartalmú *N*-(2-hidroxi-propil)-3-trimetil-ammónium-kloriddal módosított kitozán (HTCC) magra [101], ahol az optimalizált körülmények között folyamatos működésű nanokomplexációs technikával tiolcsoport nélküli és tiolcsoporttal rendelkező (SH-HyA) HyA makromolekulával átlagosan 100 nm részecskeméretet és ~ 90 % kapszulázási hatékonyságot tudtak elérni. Az előállítás metodikáját és a részecskékről készített reprezentatív TEM képeket a **8. ábra** mutatja.



8. ábra: HyA és SH-HyA-héjjal rendelkező inzulin/HTCC részecskék előállítása folyamatos működésű „nanokomplexálási” technikával és a részecskékről készített TEM képek [101]

A HyA részecskék előállítására a korábban már említett kovalens keresztkötésen vagy gyengébb elektrosztatikus kölcsönhatásokon alapuló gélesítési technikák is felhasználhatóak. Keresztkötött HyA származékok (pl. adipinsav-dihidraziddal módosított és poli(etilén-glikol)-lal keresztkötött HyA [102], α,β -poli(aszpartil-hidrazid)-dal keresztkötött HyA [103]) közül a gyakran alkalmazzák a karbodiimides technikát [60,104,105], ahol a polimer láncon lévő karboxilcsoportokat diaminos keresztkötő ágenssel kapcsoljuk össze kovalens kötések kialakítva. A módszer során stabil részecskék előállítása is lehetséges. M. Bodnár és munkatársai diaminos keresztkötési technikával sikeresen állítottak elő HyA (továbbiakban cl-HyA) nanorészecskéket [60]. A vizsgálataik során 4350 kDa molekulatömegű poliszacharid mellett annak pH= 2,0 értéken és 70 °C -on degradált 980 kDa (3 h), 660 kDa (6 h) és 350 kDa (9 h) molsúlyú fragmenseit használták. A 25, 50 és 100 %-os térhálósítással szintetizált részecskék jelentős polidiszperzitással rendelkeztek, ahol a kezdeti HyA molekulatömegétől és a keresztkötés mértékétől függően $d = 50\text{--}110\text{ nm}$ és $d = 210\text{--}500\text{ nm}$ hidrodinamikai átmérőket tudtak elérni. A HyA részecskék előállítására ritkábban használt módszer a neutralizálás, ahol kationos komponensek segítségével (pl. tenziddel, fehérjével vagy polimerrel) töltéskompenzálás révén hidrofóbizálható a makromolekula [106]. Ilyen polielektrolit komplexekként ismertek a különböző Chit-HyA alapú rendszerek, melyeket gélként vagy „állványzat” -ként (scaffold-ok) szövet gyógyuláshoz és növekedéshez is elterjedten használnak [107]. A keresztkötött és neutralizált módszerek előnye, hogy a polimer láncok részleges módosításával, a közeg pH-jával, a molekulatömeggel *stb.* a HyA tulajdonságai szabályozhatóak. A részecskék karakterizálásán kívül a kialakuló kölcsönhatások jellemzésére (főleg a töltéskompenzálással előállított rendszereknél) nagy igény van.

3. Célkitűzés

Néhány éve kutatócsoportunk egyik fő kutatási területét képezi főként szérum albumin alapú kolloidális hatóanyag hordozó részecskék előállítása és szerkezetvizsgálata [23–25]. Felhasználásuk révén a Kutatócsoport munkatársai korábban sikeresen valósították meg neuroaktív vegyületek vér-agy gáton való átjuttatását, melyet elfogadott magyarországi szabadalom is igazol. Ezen kutatásokhoz kapcsolódtam 2017. őszén, ahol egy újonnan elnyert GINOP-2.3.2 pályázat keretein belül, kiemelt feladatom volt új típusú, döntően polimer és poliszacharid alapú hatóanyag hordozó rendszerek tervezése, optimalizálása és reprodukálható szintézisek kidolgozása. Mindezek mellett fő feladatom volt az előállított rendszerek méretének, szerkezetének, kapszulázási hatékonyságának és lehetőség szerint a hatóanyag felszabadulás kinetikájának tanulmányozása és értelmezése.

A szakirodalomban széles körben használt PLA/PLGA hatóanyag hordozó rendszerek előállítására egy jól alkalmazható technika az oldószercserén alapuló nanoprecipitációs módszer [43]. Az eljárás alkalmazásakor a részecskék szerkezetét, méretét és a hatóanyagok kapszulázási hatékonyságát jelentősen befolyásolhatják az előállításoknál alkalmazott kezdeti paraméterek (pl.: molekulatömeg, stabilizátor típusa, pH, koncentráció stb.). Az irodalomban PLA/PLGA makromolekulákon kívül a HyA poliszacharidot is egyre elterjedten alkalmazzák hatóanyag hordozó rendszerek kialakítására [92]. Jól ismert, hogy ezen poliszacharid szerkezeti módosításával (pl. térhálósítás, neutralizálás), a PLA/PLGA polimerekhez hasonlóan, kolloid részecskék állíthatóak elő. illetve a szerkezeti módosítás típusától és kísérleti körülményeitől függően, a részecskék méretétől egészen a hatóanyag leadásig, számos szerkezeti és funkcionális paraméter szabályozható.

Mindezen ismereteket szem előtt tartva, doktori munkám során célul tűztük ki PLA és eltérő hidrofilitási tulajdonsággal rendelkező PLGA kopolimerek előállítását és lehetséges felhasználásukat kolloidális hatóanyag hordozó részecskék előállítására. Vizsgálataink során tanulmányozni kívántuk egyrészt, hogy különböző töltésű és molekulatömegű stabilizátorok (cetil-trimetil-ammónium-bromid (CTAB), polivinil-alkohol (PVA), Pluronic F127 (PLUR)), illetve eltérő forráspontú és sűrűségű oldószerek (aceton, 1,4-dioxán) felhasználása révén a makromolekulás kolloidokból felépülő hatóanyag hordozó részecskék stabilitása, mérete és morfológiája milyen mértékben változtatható. Értelmezni kívántuk továbbá a modellként alkalmazott, eltérő oldékonyságú, töltésű és szerkezetű hatóanyag molekuláknak (ketoprofen (KP), (\pm) - α -tokoferol (TP), *D*- α -tokoferol-polietilén-glikol-

1000-szukcinát (TPGS)) a részecskék szerkezetére, méretére és kapszulázási hatékonyságára gyakorolt hatását is.

Kutatómunkám másik fő feladata volt a nanoprecipitációs eljárással előállított PLA/PLGA alapú, TP hatóanyag-tartalmú kolloid részecskék előállításának megvalósítása folyamatos áramlási technikával is. Tanulmányozni kívántuk, hogy a preparálás során lehetségesen beállítandó paraméterek (pl.: kiindulási koncentráció, áramlási sebesség, áramlási sebesség arányok, nyomás) szisztematikus változtatása révén szabályozható-e reprodukálisan a részecskék mérete, szerkezete vagy éppen a hatóanyag tartalom. Az előállított részecskék *in vitro* körülmények közti kioldódási folyamatainak vizsgálata is a munka részét képezte. Célunk volt összehasonlítani, hogy ezen eljárás ígéretesnek mutatkozik-e az irodalomban gyakorta alkalmazott nanoprecipitációs technika mellett.

A PLA/PLGA hordozó rendszerekkel kapcsolatos vizsgálatok mellett az értekezés másik nagy fejezetét képezte a rendkívül hidrophil tulajdonságú, közepes molekulatömegű HyA (M-HyA) makromolekula hatóanyag hordozóként történő alkalmazhatóságának feltérképezése is hidrofób KP molekulák kapszulázására a poliszacharid eltérő mértékű térhálósításának kivitelezése révén. Mindezekon túl célunk volt tanulmányozni, hogy hidrofób KP molekulák kapszulázása megvalósítható-e a M-HyA pozitív töltésű felületaktív anyaggal (CTAB) történő részleges neutralizálása révén is. A kétféle eljárással előállított kolloid részecskék teljeskörű szerkezeti karakterizálása mellett a hatóanyag hordozókból történő kioldódási folyamatának feltérképezése is a vizsgálataink részét képezte.

A HyA felületaktív anyaggal történő részleges neutralizálási folyamatának ismeretében az értekezésben további célul tűztük ki annak tanulmányozását is, hogy előállítható-e HyA alapú hordozó részecske, ha a CTAB helyettesítésére egy monomer egységenként egy pozitív töltésű makromolekulát, a kitozánt alkalmazzuk. Meghatározni kívántuk, hogy a monomer egységenként egy negatív töltéssel rendelkező nagy molekulatömegű HyA (H-HyA) és az egy pozitív töltéssel rendelkező Chit között fellépő elektrosztatikus kölcsönhatások mértéke hogyan változik a HyA/Chit tömegarányok változtatásnak hatására. Az optimalizált arányok ismeretében megkíséreltük különböző típusú HyA/Chit alapú komplex hordozó részecskék előállítását és a képződő kolloid részecskék szerkezetvizsgálatát is, de ez a rész már nem képezte szerves részét az értekezésemnek.

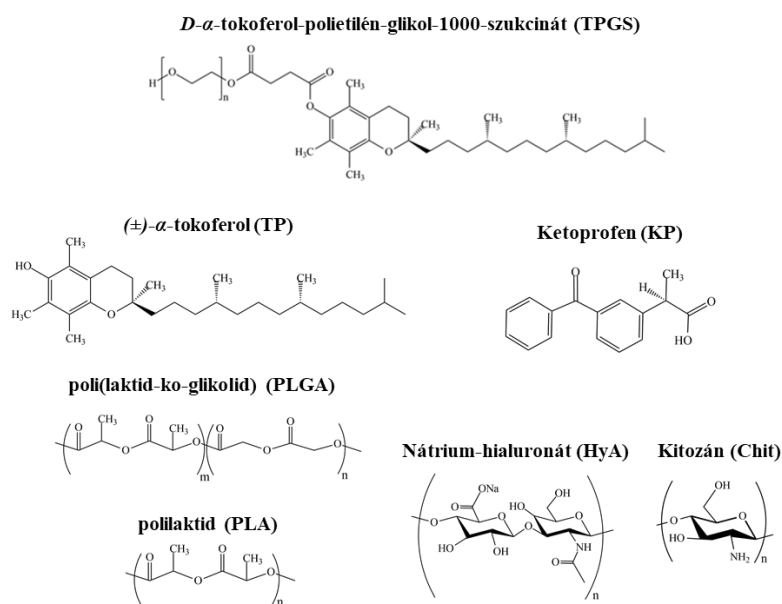
4. Felhasznált anyagok, szintézisek és vizsgálati módszerek

4.1. Felhasznált anyagok

- 3,6-dimetil-1,4-dioxán-2,5-dion (LA, *D,L*-laktid, $C_6H_8O_4$, $\geq 99\%$, *Sigma*)
- 1,4-dioxán-2,5-dion (GA, glikolid, $C_4H_4O_4$, $\geq 99\%$, *Sigma*)
- Ón(II)-2-etilhexanoát ($C_{16}H_{30}O_4Sn$, $\geq 96\%$, *Alfa Aesar*)
- 1-dodekanol ($C_{12}H_{26}O$, $\geq 98\%$, *Fluka*)
- 2,2'-(etiléndioxi)bisz(etilamin) (EDEA, $NH_2CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2NH_2$, $\geq 98\%$, *Sigma*)
- 1-[3-(dimetil-amino)propil]-3-etil-karbodiimid-metil-jodid (EDC metil-jodid, $C_2H_5N=C=N(CH_2)_3N(CH_3)_3I$, $\geq 99\%$, *Sigma*)
- Pluronic F127 (PLUR, $(OCH_2CH_2)_x(OCH_2CH(CH_3))_y(OCH_2CH_2)_z$, $M_w \approx 12,6$ kDa, $\geq 99\%$, *Sigma*)
- Polivinil-alkohol (PVA, $(C_2H_4O)_x$, $M_w \approx 72$ kDa, $\geq 99\%$, *Sigma*)
- Cetil-trimetil-ammónium-bromid (CTAB, $CH_3(CH_2)_{15}N(Br)(CH_3)_3$, $\geq 95\%$, *Sigma*)
- (\pm) - α -tokoferol (TP, $C_{29}H_{50}O_2$, $\geq 96\%$, *Sigma*)
- *D*- α -tokoferol-polietilén-glikol-1000-szukcinát (TPGS, $(C_2H_4O)_x(C_{33}H_{54}O_5)$, $\geq 99\%$, *Sigma*)
- Ketoprofen (KP, $C_{16}H_{14}O_3$, $\geq 98\%$, *Sigma*)
- Poli(tejsav) (PLA, $(C_3H_4O_2)_x$, $M_w = 250$ kDa, $\geq 99\%$, *Fluka*)
- Poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA75, $(C_6H_8O_4)_x(C_4H_4O_4)_y$, laktid:glikolid arány 75:25, $M_w = 40-75$ kDa, $\geq 99\%$, *Sigma*)
- Poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA65, $(C_6H_8O_4)_x(C_4H_4O_4)_y$, laktid:glikolid arány 65:35, $M_w = 60-107$ kDa, $\geq 99\%$, *Sigma*)
- Poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA50, $(C_6H_8O_4)_x(C_4H_4O_4)_y$, laktid:glikolid arány 50:50, $M_w = 30-60$ kDa, $\geq 99\%$, *Sigma*)
- Közepes molekulatömegű kitozán (M-Chit., $(C_6H_{11}O_4N)_x$, $M_w = 190-310$ kDa, 75-85 % deacetilezett, *Sigma*)
- Nagy molekulatömegű kitozán (H-Chit, $(C_6H_{11}O_4N)_x$, $M_w = 310-375$ kDa, $\geq 75\%$ deacetilezett, *Sigma*)
- Közepes molekulatömegű nátrium-hialuronát (M-HyA, $(C_{14}H_{21}O_{11}N)_x$, $M_w = 1,5-1,8 \times 10^3$ kDa, $\leq 1\%$ fehérje, *Sigma*)
- Nagy molekulatömegű nátrium-hialuronát (H-HyA, $(C_{14}H_{21}O_{11}N)_x$, $M_w = 200-500$ kDa, *Richter Gedeon Nyrt.*)

- Dinátrium hidrogén-foszfát (Na_2HSO_4 , $\geq 99\%$, *Molar*)
- Nátrium-dihidrogén-foszfát monohidrát ($\text{NaH}_2\text{SO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, $\geq 99\%$, *Sigma*)
- Nátrium-klorid (NaCl , $\geq 99\%$, *Molar*)
- Tripolifoszfát (TPP, $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, $\geq 98\%$, *Merk KGaA*)
- Nátrium hidroxid (NaOH , $\geq 99\%$, *Molar*)
- Sósav (HCl , 37% , *Molar*)
- Ecetsav (CH_3COOH , $\geq 99,5\%$, *Erdőkémia*)
- 1,4-dioxán ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$, $\geq 99,8\%$, *Sigma*)
- Aceton (CH_3COCH_3 , $\geq 99,5\%$, *Sigma*)
- Etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, $\geq 99,9\%$, *Molar*)
- cellulóz alapú dialízis membrán (cut off: 14000, *Sigma*)

A hatóanyag tartalmú hordozó rendszerek előállításához felhasznált polimerek monomer egységeit, illetve a hatóanyagok szerkezeti képleteit a **9. ábra** foglalja össze.



9. ábra: A hordozó rendszerek előállításához használt polimerek monomer egységei és a hatóanyagok szerkezeti képletei

A mérésekhez alkalmazott vegyszerek analitikai tisztaságúak voltak, ezért felhasználásuk előtt további tisztításra nem volt szükség. A vizes közegű oldatokhoz és polimer alapú részecskék előállításához minden esetben nagy tisztaságú Milli-Q vizet (Millipore, Milli-Q, Integral3, fajlagos ellenállás $18,2 \text{ m}\Omega \times \text{cm}$ 25°C -on) alkalmaztunk. A hatóanyag kioldódásával kapcsolatos vizsgálatoknál, illetve a szintéziseknél heti

rendszerességgel elkészített NaCl tartalmú foszfát puffert (továbbiakban PBS, pH= 7,4) használtunk. A PBS oldat a következő összetétellel rendelkezett: 2,25 g NaCl (0,15 M, 0,9 m/m%), 0,5497 g Na₂HPO₄ és 0,1558 g NaH₂PO₄×H₂O 250 cm³ térfogatú, Milli-Q vízben feloldva.

4.2. Szintézisek

4.2.1. Poli(laktid-ko-glikolid) kopolimerek szintézise

A PLA és különböző hidrofilitási tulajdonsággal rendelkező PLGA kopolimereket gyűrű-felnyitós polimerizációval (ROP) állítottuk elő [81,82,108]. Ehhez a reakcióhoz a tejsav és a glikolsav ciklusos dimerjét (*D,L*-laktid és glikolid), ón(II)-2-etilhexanoát katalizátort és 1-dodekanol iniciátort használtuk. A szintézis alatt az ón(II)-2-etilhexanoát a polimerizációs folyamatot katalizálja, míg az 1-dodekanol kettős szerepének köszönhetően aktiválja a katalizátort és nukleofil ágensként elősegíti a ciklikus dimerek gyűrűfelnyitását. Az eljárás során a szükséges mennyiségű laktidot (PLA: 5,0015 g; PLGA75: 3,7520 g; PLGA65: 3,2513 g), glikolidot (PLA: 0 g; PLGA75: 1,2510 g; PLGA65: 1,75602 g)³, 0,02 w/w% (teljes dimer tömegre nézve) ón(II)-2-etilhexanoát katalizátort és 0,01 w/w% (a teljes dimer tömegre nézve) 1-dodekanol iniciátort egy gömblombikban homogenizáltuk és a rendszert vákuum alá helyeztük. A polimerizáció elindításához a lombikot T= 170-180 °C -ig előmelegített olajfürdőbe tettük és - a homogenitás fenntartása érdekében - a mintát 2 órán át kevertettük. Az ilyen módon nyert végterméket -20 °C hőmérsékleten tároltuk. Mivel mind az iniciátor, mind a katalizátor nagyon kis mennyiségben volt jelen a reakcióelegyben, így az irodalmi hivatkozásoknak megfelelően, [81,82], további tisztítási eljárást nem alkalmaztunk.

4.2.2. PLA/PLGA hordozó rendszerek szintézise nanoprecipitációs módszerrel

A szintetizált PLA/PLGA polimerekből a részecskék előállítása nanoprecipitációs technikával történt, ahol a kísérleteket több oldószerben és számos stabilizálószer alkalmazása mellett is kiviteleztük. A törzsoldatok elkészítésekor a polimereket minden esetben szerves oldószerben (acetone vagy 1,4-dioxán), míg a stabilizátorokat (CTAB, PVA, PLUR) nagy tisztaságú Milli-Q vízben oldottuk. A szerves:vizes fázisok térfogatarányát mindig 1:10 értéken tartottuk.

³ Az egyes laktid és glikolid mennyiségek az adott jelzésű PLA/PLGA75/PLGA65 származékok előállításához szükséges mennyiségeket mutatják.

A polimer hidrofilitásának ill. a stabilizátorok és az oldószer hatásának tanulmányozásához a PLA/PLGA makromolekulák 15-15 mg mennyiségét feloldottuk 1,5 mL szerves oldószerben, majd a kapott törzsoldatot 15 mL 0,1 mg/mL koncentrációjú stabilizátor-tartalmú vizes oldatba csepegtettük 10 μ L/5 s sebességgel, szobahőmérsékleten. A folyamat során a komponenseket mágneses keverőt használva 1000 rpm fordulatszámmal kevertettük.

A hatóanyag (KP, TP, TPGS)-tartalmú PLA/PLGA részecskék előállításánál az előzőkkel megegyező koncentrációkat és szintézis körülményeket alkalmaztunk. A hatóanyagok 7,5-7,5 mg mennyiségét (polimer:hatóanyag 1:2 tömegarány) oldékonyságuknak megfelelően a szerves fázisú polimert (KP, TP) vagy a vizes fázisú stabilizátort (TPGS) tartalmazó oldatokhoz adtuk. A modellként választott három hatóanyag közül a legrosszabb vízoldékonysággal rendelkező TP esetén koncentrációfüggő előállítási kísérleteket is végeztünk. A részecskék szintézisét első körben PLA polimer, PLUR stabilizátor és acetone oldószer alkalmazása mellett végeztük el. Ebben az esetben a 1,25-10,0 mg/mL PLA és 0,0-5,0 mg/mL TP koncentrációjú acetonos törzsoldatokat 10-10 mL 0,0-1,0 mg/mL koncentrációjú PLUR oldatokba cseppentettük a fentebb már említett szintézis paraméterek alkalmazása mellett (1000 rpm, 10 μ L/5 s adagolási sebesség, 25 °C). Az egyes mintáknál beállított komponens koncentrációkat az **1. táblázat** foglalja össze.

1. táblázat: A PLA alapú, TP-tartalmú koloid részecskék előállításához használt komponensek koncentráció és térfogat adatai

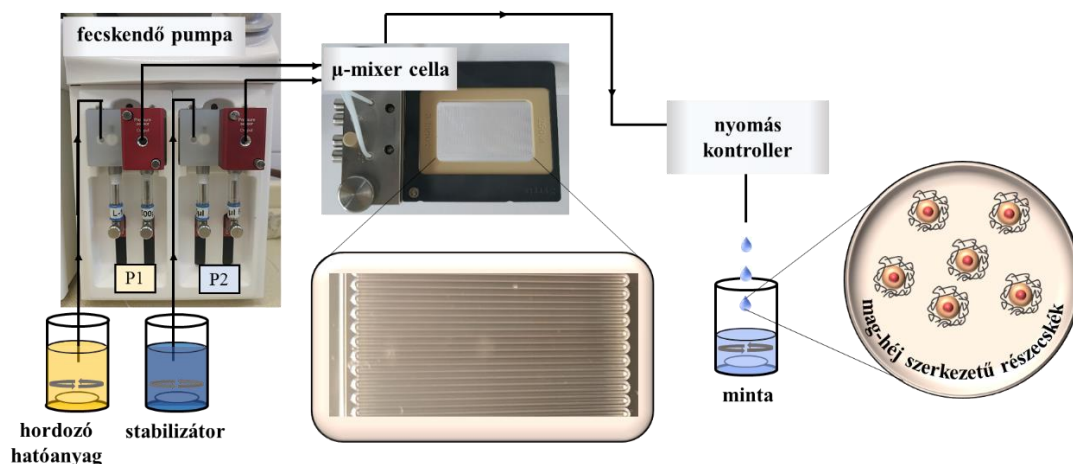
Minta	Aceton fázis		Vizes Fázis
	C _{PLA} (mg/mL)	C _{TP} (mg/mL)	C _{PLUR} (mg/mL)
1	1,25	2,5	0,10
2	2,50	2,5	0,10
3	5,00	2,5	0,10
4	10,0	2,5	0,10
5	10,0	0,0	0,10
6	10,0	0,5	0,10
7	10,0	1,0	0,10
8	10,0	2,5	0,10
9	10,0	5,0	0,10
10	10,0	2,5	0,00
11	10,0	2,5	0,05
12	10,0	2,5	0,10
13	10,0	2,5	0,50
14	10,0	2,5	1,00

A vizsgálatokat a PLGA65 és PLGA75 alapú rendszerek esetén is elvégeztük a PLA esetén optimalizált arányok alapján. Ezeket, mint új tudományos eredményeket az *5. fejezet*

foglalja össze. A nanoprecipitációs módszerrel előállított diszperziókat minden esetben 48 h-ig 350 rpm fordulatszámon kevertettük, majd tisztítottuk. A tisztításkor a mintákat további 40-40 mL Milli-Q vízzel hígítottuk és 12000 rpm fordulatszámon ($t = 15$ min, $T = 25$ °C) centrifugáltuk egy Hermle Z36HK centrifugával. Az így kapott felülúszót eltávolítottuk és a részecskéket 40 mL Milli-Q vízben diszpergáltuk, majd ezen tisztítási eljárást kétszer is megismételtük.

4.2.3. PLGA50 részecskék előállítása áramlásos rendszerben

A PLGA50 részecskék áramlásos technikával történő előállításához 5,0 mg/mL koncentrációjú PLGA50 kopolimert és 1,25 mg/mL koncentrációban TP-t tartalmazó acetonos oldatot és 0,1 mg/mL koncentrációjú vizes PLUR oldatot használtunk. A méréseket hatóanyag nélkül is elvégeztük. A részecskék szintéziséhez két fecskendő pumpával, nyomás kontrollerral és egy 250 μ L térfogatú három bemenetű μ -mixer cellával rendelkező Syrris Asia Flow rendszert használtunk. A módszer sematikus ábráját a **10. ábra** szemlélteti. A szintézis folyamán a két törzsoldatot a fecskendő pumpák juttatják el a μ -mixer cellába, ahol a fázisok keveredése révén a PLGA50 precipitációja megtörténik és kolloid részecskék képződnek. A méréseket különböző áramlási sebességeken (szerves fázis: $v_1 = 25$ -150 μ L/perc, vizes fázis: $v_2 = 250$ -1500 μ L/perc, $v_1:v_2$ arány állandó) eltérő áramlási sebesség arányokon ($v_1 = 25$ μ L/min állandó, $v_2/v_1 = 10$ -50) és különböző cella nyomásokon ($v_1 = 25$ μ L/perc, $v_2 = 250$ μ L/perc, $p = 2$ -10 bar) is elvégeztük. A polimer diszperziók tisztítása a nanoprecipitációs módszernél korábban már említett eljárással történt.



10. ábra: A PLGA50 kopolimer alapú kolloid részecskék előállításához használt Syrris Asia Flow áramlásos rendszer sematikus ábrája

4.2.4. Térhálósított nátrium-hialuronát részecskék előállítása

Az eltérő mértékben keresztkötött M-HyA (továbbiakban *cl-M-HyA/50%*, *cl-M-HyA/75%* és *cl-M-HyA/100%*) részecskék előállításához a jelölésben megadott 50%, 75% és 100% mértékű térhálósítást alkalmaztunk. A szintézis első lépéseként 200 mL 1 mg/mL koncentrációjú vizes M-HyA oldatokat készítettünk, amelyek pH-ját pH= 5,5 értékre állítottuk be 0,1 M koncentrációjú NaOH oldattal. Ezen oldatokhoz a keresztkötés mértékét figyelembe véve rendre 1,88 mL (50%), 2,82 mL (75%) és 3,76 mL (100%) EDEA oldatot (1 v/v%, pH= 5,5) adtunk. A reakcióelegyhez 30 perces kevertetés után 80 mg (50%), 120 mg (75%) és 160 mg (100%) EDC metil-jodidot tartalmazó vizes oldatot csepegtettünk. Az így elkészített termékeket egy éjszakán át kevertettük, majd a termékeket 7 napon keresztül nagy tisztaságú Milli-Q vízben dialízissel tisztítottuk. A HyA alapú kolloid részecskék képződése a térhálósítással párhuzamosan megtörténik. A KP-tartalmú *cl-M-HyA* alapú rendszerek előállítása állandó ionerősségű PBS oldatban (pH= 7,40; 0,9 % NaCl) történt, mivel a KP vízzoldékonysága puffermentes közegben alacsony ($c_{KP,max}= 0,051$ mg/mL). A *cl-M-HyA/KP* minták előállításánál 20 mg/mL KP és 100 mg/mL előzetesen szintetizált és liofilizált *cl-M-HyA/50%*, 75% és 100% tartalmú elegyeket készítettünk, majd 24 óráig kevertettük őket. A tisztítás folyamata során a mintákat 0,1 v/v% koncentráció eléréséig hígítottuk és 8000 rpm fordulatszámon 10 percig centrifugáltuk a felesleges és nem kötött hatóanyag eltávolítása végett.

4.2.5. M-HyA/CTAB kompozit részecskék előállítása

A M-HyA/CTAB részecskék tanulmányozásához elkészített oldatsorozatnál 0,2 mg/mL M-HyA koncentráció mellett a CTAB mennyiségét 0,00-0,26 mg/mL között szisztematikusan változtattuk PBS közegben ($m_{CTAB}/m_{HyA}= 0-1,3$). A CTAB koncentrációjának beállításához 0,02 M koncentrációjú törzsoldatot használtunk. A KP hatóanyagot is tartalmazó M-HyA/CTAB minták előállításakor a *cl-M-HyA/KP* rendszerhez hasonlóan PBS közegben végeztük vizsgálatainkat. A kapszulázást 20 %-, 50 %- és 80 % -ban neutralizált M-HyA/CTAB mintáknál végeztük el, ahol az oldatokban a M-HyA és a KP koncentrációja $c_{HyA}= 100$ mg/mL és $c_{KP}= 20$ mg/mL, míg a CTAB mennyisége 18 mg/mL, 46 mg/mL, és 73 mg/mL volt. A mintákat 24 óráig kevertettük és a 4.2.4. alfejezetben említett módon tisztítottuk.

4.3. Vizsgálati módszerek és mérési körülmények

4.3.1. A hordozó rendszerek jellemzésére szolgáló módszerek és technikák

A **Fourier-transzformációs infravörös (FT-IR)** spektroszkópiás mérésekhez egy egyszeres reflexiójú ATR Pro One feltétellel ellátott Jasco FT/IR-4700 spektrométert használtunk. A vizsgálatokhoz liofilizált pormintákat alkalmaztunk. A spektrumokat 256 interferogram átlagolásával, 4 cm^{-1} felbontással, $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ tartományon vettük fel. A detektált karakterisztikus rezgési sávok alapján a szintetizált és módosított biopolimerekben végbement szerkezeti változásokról kaptunk információt.

A **differenciális pásztázó kalorimetriás (DSC)**, **termogravimetriás (TG)** és a **differenciális termoanalitikai (DTA)** mérések kivitelezése egy Mettler-Toledo 822e kaloriméterrel és egy Mettler-Toledo TG/SDTA 851^o műszerrel történt. A detektált DSC görbékét $25\text{--}500\text{ }^{\circ}\text{C}$, míg a TG és DTA görbékét $25\text{--}1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérséklet-tartományon vettük fel $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{perc}$ felfűtési idő és $50\text{ mL}/\text{perc}$ áramlási sebességű nitrogén (DSC) és levegő (TG, DTA) közeg beállítása mellett. Az eredményeket STARe 12.10 szoftverrel értékeltük ki.

A PLA/PLGA polimerek hidrofilitási tulajdonságainak jellemzésekor elvégzett **peremszög mérésekhez** egy $0,5\text{ mm}$ átmérőjű, acél tűvel felszerelt fecskendővel és egy nagy felbontású kamerával rendelkező KRÜSS FM40Mk2 Easy Drop műszert használtunk. A vizsgált PLA/PLGA film rétegeket az egyes polimerek $160\text{--}170^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten, mikroszkóp tárgylemez üveg felületére történő olvasztásával állítottunk elő. A peremszög értékeket $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten és légköri nyomáson határoztuk meg 5-5 párhuzamos mérés átlagából, ahol nagy tisztaságú Milli-Q vízből cseppentettünk 1-1 cseppet ($10\text{--}10\text{ }\mu\text{L}$ mennyiséget) a polimer filmek felületére.

A szintetizált PLA/PLGA kopolimerek **molekulatömegének meghatározásához** egy Horiba SZ-100 típusú fényszórásmérőt használtunk ($\lambda_{\text{lézer}} = 532\text{ nm}$). A molekulatömeg (M_w) és a második viriál együttható (A_2) értékeket a Rayleigh-Gans-Debye modellel (**1. egyenlet**) kaptuk meg:

$$\frac{Kc}{R_{\text{ex}}} = \frac{1}{M_w} + 2A_2c \quad (1.)$$

ahol K a Debye konstans, c a minta koncentrációja, R_{ex} a többlet Rayleigh arány, M_w az átlagos molekulatömeg és A_2 a második viriál együttható.

A Debye konstans értéke a **2. egyenlet** alapján határozható meg:

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2 (dn/dc)^2}{\lambda^4 N_A} \quad (2.)$$

ahol n_0 a diszperziós közeg törésmutatója, dn/dc a minta törésmutatójának növekedése a koncentráció függvényében, λ az alkalmazott fény hullámhossza vákuumban és N_A az Avogadro szám. Mindezeken felül a többlet Rayleigh arányt a következőképpen határozhatjuk meg (**3. egyenlet**):

$$R_{ex} = R_{ref} \frac{n_0^2}{n_{ref}^2} \left(\frac{I_{minta} - I_0}{I_{ref}} \right) \quad (3.)$$

ahol R_{ex} a többlet Rayleigh arány, R_{ref} egy jól ismert referencia közeg Rayleigh aránya, n_0 a diszperziós közeg törésmutatója, n_{ref} a referencia közeg törésmutatója, I_{minta} a mért minta szórási intenzitása, I_0 a diszperziós közeg szórási intenzitása és I_{ref} a referencia közeg szórási intenzitása.

A vizsgálatok során 0-20 mg/mL koncentrációjú PLA/PLGA 1,4-dioxán közegű oldatait használtunk. A Debye konstans determinálásához fontos dn/dc értéket a mérésekhez elkészített oldatok Mettler Toledo RM50 típusú refraktométerrel meghatározott törésmutató értékei alapján határoztuk meg. A többlet Rayleigh arány kiszámításához referencia oldószerként toluolt használtunk. A módszer érzékenysége tekintettel a felhasznált analitikai tisztaságú oldószereket (előzetesen 1,4-dioxánnal, toluollal és Milli-Q víz) előzetesen 0,2 μ m pórusméretű szűrőn átszűrtük (szerves oldószereknél: Hidrofób PTFE szűrő, Milli-Q víznél: Hidrofil Nylon szűrő).

A HyA/Chit rendszerrel **töltéstitrálási** méréseket végeztünk a két makromolekula közötti töltéskompenzálási pont kvantitatív meghatározásához, melyhez egy Műtek PCD-04 részecske töltés detektort alkalmaztunk. A mérések során 10-10 mL 0,5-2,0 % ecetsavas közegű 0,045 mg/mL koncentrációjú HyA oldatokat titráltunk 0,091 mg/mL koncentrációjú (az előzőkkel azonos ecetsavas közegű) Chit oldattal, ahol 125-125 μ L adagokban adtuk a Chit oldatot és minden pontban az áramlási potenciál értékeket rögzítettük. A HyA töltéskompenzálási pontját (un. áttöltési pontot, ahol a mért áramlási potenciál értéke eléri a 0 mV-os értéket) a titrálási görbék módosított Boltzmann egyenlettel (**4. egyenlet**) történő illesztéséből határoztuk meg [109], figyelembe véve, hogy a szigmoid görbék torzultak:

$$Y = \frac{a_1 x + a_2}{1 + \exp[(x - a_4)/a_3]} + a_5 x + a_6 \quad (4.)$$

ahol Y a függő változó (a mért áramlási potenciál értékek), x a független változó (Chit és HyA molaránya) és a_i az illesztési paraméterek. Az a_1 és a_2 a titrálási görbe alsó és felső szakaszának aszimptotikus értékei, a_3 az átmeneti szakasz szélessége, a_4 az inflexiós pontban az x független változó értéke, míg az $(a_1 a_4) + a_2$ kifejezés az inflexiós pontban a titrálási görbe alsó és felső szakaszának távolsága (a függő változó mértékegységében). Az egyenlet számlálójában és a jobb oldalt lévő kifejezés figyelembe veszi az induló és megállapodó tartomány eltolódását. A paramétereket ismerve kiszámíthatjuk a Chit:HyA molarányokat az áttöltési pontjában ($Y = 0$ mV).

Az **izoterm titrációs kalorimetriás (ITC)** mérések kivitelezése a HyA/CTAB alapú hordozó rendszerek esetében Dr. Juhász Ádám (SZTE TTIK Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék) segítségével történtek. Az egyes entalprogramok rögzítéséhez egy számítógép kontrollált MicroCal VP-ITC típusú izoterm titrációs kalorimétert alkalmaztunk, amely egy 1,4301 mL mintacellával és 300 μ L ösztérfogatú fecskendővel rendelkezik. A mintacellában titrálandó oldatként 1,4 mL 0,1 mg/mL koncentrációjú HyA oldatot használtunk, míg titrálószerként 12 mM és 5 mM koncentrációjú CTAB oldatot. A mérések kivitelezése révén a CTAB kritikus micellaképződési koncentrációját (cmc) kívántuk meghatározni HyA jelenlétében. Referenciaként a CTAB cmc értékét is meghatároztuk, ahol a titrálandó oldat nagy tisztaságú Milli-Q víz volt. A mérések 25 °C hőmérsékleten és 10 μ L/5 perc adagolási sebességen zajlottak. Az entalpogrammok kiértékelése egy Origin Microcal 7.1 szoftverrel történt. A CTAB cmc értékét a töltéstitrálási vizsgálatoknál bemutatott módosított Boltzmann egyenlettel (**4. egyenlet**) határoztuk meg, ahol független változó a tenzid koncentrációja ($x = c$), míg a függő változók a mért entalpia értékek ($Y = \Delta H$) voltak.

A TP oldhatóságának meghatározásához, továbbá a hatóanyag nélküli M-HyA/CTAB kompozitok szerkezeti jellemzéséhez és a PLGA kopolimerekkel kapcsolatos precipitációs titrálások minősítéséhez **turbidimetriás** méréseket végeztünk, melyhez egy LP2000 Hanna Ins. típusú zavarosságmérő készüléket és utóbbi esetben egy Ocean Optics USB4000 egyfényutas spektrofotométert használtunk. A fotometriás mérések esetében 650 nm hullámhosszon detektáltunk és a méréseket 1 cm úthosszú kétoldalú kvarc küvettában végeztük el. A polimerek precipitációs tulajdonságait az abszorbancia és 100 % turbiditás esetében mért maximum abszorbancia arányt a Milli-Q víz térfogat és a teljes térfogat arányának függvényében ábrázolt görbék segítségével határoztuk meg.

A M-HyA/CTAB rendszernél a **konduktometriás** titrálási görbék rögzítése egy Radelkis OK-114 konduktométerrel történt szobahőmérsékleten. A mérések kivitelezése révén a CTAB *cmc* értékét kívántuk meghatározni HyA jelenlétében. Referenciaként a CTAB *cmc* értékét is meghatároztuk. A mérések során a vezetőképesség értékeket rögzítettük, amely során 20-20 mL nagy tisztaságú Milli-Q vízhez és 0,1 mg/mL koncentrációjú M-HyA oldathoz adagoltunk külön-külön 20 mM CTAB oldat 40-40 μ L mennyiségeit.

A **reológiai mérések** kivitelezésében Dr. Juhász Ádám segédkezett. A vizsgálatokat egy Anton Paar MCR 301 típusú reométerrel végeztük el dupla rés (DG26.7-SN12740), kúp-lap (CP25-1-SN12204) és koncentrikus henger (CC27-SN12740) geometriájú feltétekkel $25 \pm 0,1$ °C-os hőmérsékleten. Annak érdekében, hogy a hőmérséklet állandósuljon a rendszerben a mintákat 5 percig a feltétben állni hagytuk.

A kis koncentrációjú (0,05-0,1 mg/mL) M-HyA oldatok viszkozitási és nyírófeszültség értékeit 1-300 1/s nyírósebességen és dupla rés geometriájú feltéttel határoztuk meg. A nagy koncentráció M-HyA (25-100 mg/mL) oldatok esetében a méréseket kúp-lap geometriájú feltéttel végeztük el 1-40 1/s nyírósebesség tartományon. A tömény M-HyA tixotróp tulajdonságának meghatározásakor a viszkozitási értékeket növekvő és csökkenő nyírósebességeken is megvizsgáltuk. A folyásgörbét Bingham modellel (**5. egyenlet**), illetve az egyes viszkozitási görbékre illesztett Carreau-Yasuda egyenlettel (**6. egyenlet**) értékeltük ki a RheoPlus szoftver segítségével.

$$\tau = \tau_B + \eta_{pl} \dot{\gamma} \quad (5.)$$

ahol τ a nyírófeszültség, τ_B a lineáris szakaszból nulla nyírósebességre történő extrapolálással meghatározott Bingham-féle folyáshatár és η_{pl} az egyenes meredekségéből kapott plasztikus viszkozitás.

$$\eta = \eta_{\infty} + (\eta_0 - \eta_{\infty}) [1 + (\lambda \dot{\gamma})^a]^{(n-1)/a} \quad (6.)$$

ahol η a viszkozitás, η_{∞} a végtelen-nyírási viszkozitás, η_0 a nulla-nyírási viszkozitás, $\dot{\gamma}$ a nyírósebesség, λ a relaxációs idő, n ($n < 1$) és a konstans.

A konstans nyírási sebességeken elvégzett reológiai méréseknél a koncentrikus henger geometriájú feltétben lévő 19 mL 0,1 mg/mL kezdeti koncentrációjú HyA oldatokat titráltunk meg 25 mM CTAB (5 percenként 20 μ L) és 2 mg/mL Chit (3 percenként 40 μ L) törzsoldattal. A M-HyA/CTAB rendszernél a méréseket nagy tisztaságú Milli-Q vízben, míg

a M_Chit/H-HyA esetében 0,5-2 v/v%-ban ecetsavat is tartalmazó közegben végeztük el. A viszkozitás változását $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ -on, 150 1/s (CTAB) és 300 1/s (M-Chit) nyírósebességeken követtük. A rendszer hígulása miatt bekövetkező viszkozitás-csökkenés korrigálása érdekében a titrálásokat a megfelelő tiszta oldószerekkel is elvégeztük. A HyA gélek viszkoelasztikus paramétereinek tanulmányozásához amplitúdó sepréses **oszcillációs reológiai méréseket** használtunk, ahol a mintákat szinuszos nyírási deformációnak (nyírás, nyírási alakváltozás) tettük ki. A nyírási deformációra az alábbi **7. egyenletet** írhatjuk fel:

$$\gamma = \gamma_0 \sin(\omega t) \quad (7.)$$

ahol γ a nyírási deformáció, γ_0 a nyírási deformáció amplitúdója, ω az oszcillációs frekvencia és t az idő.

A viszkoelasztikus anyagok elasztikus (Hooke-test) és viszkózus (Newton-test) sajátságait a nyírófeszültségből (τ) kifejezett **8. egyenlet** alapján jellemezhetjük:

$$\tau = G'(\omega) \gamma_0 \sin(\omega t) + G''(\omega) \gamma_0 \cos(\omega t) \quad (8.)$$

ahol γ_0 a nyírási deformáció amplitúdója, ω az oszcillációs frekvencia, t az idő, G' az elasztikus tulajdonságot jellemző tárolási modulus, G'' a viszkózus tulajdonságot jellemző veszteségi modulus. A tárolási és veszteségi modulus arányát a veszteségtangens adja meg (**9. egyenlet**):

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (9.)$$

Az egyenletben szereplő δ a fáziseltolódás, amelynek fokba megadott értékéből következtethetünk az anyag folyási tulajdonságát (ideális elasztikus: $\delta = 0^\circ$, viszkoelasztikus: $0^\circ < \delta < 90^\circ$, ideálisan viszkózus: $\delta = 90^\circ$). A tömény és módosított (neutralizálás, térhálósítás) HyA géleknél alkalmazott amplitúdó sepréses módszer esetén a nyírás folyamatos növelése mellett (0,01-100 %) meghatároztuk a G' , G'' ill. a korábban már említett szoftverrel a folyási pontot (τ_{fp}) és keresztezési pontot ($\dot{\gamma}_{cop}$) állandó 10 Hz-es oszcillációs frekvencián. A mérések kivitelezéséhez kúp-lap geometriájú feltétet és $T = 25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ használtunk.

4.3.2. Részecskék méretének és szerkezetének meghatározása

A **dinamikus fényszórás (DLS)** és **ζ -potenciál méréseket** a PLA/PLGA és Chit/HyA részecskéknél a korábban említett Horiba SZ-100 típusú, míg a HyA/CTAB és cl-M-HyA rendszereknél egy Malvern NanoZS fényszórásmérővel ($\lambda_{\text{lézer}} = 633 \text{ nm}$, He-Ne lézer)

végeztük $25 \pm 0,1$ °C-on. A hidrodinamikai átmérő (d_{DLS}), a polidiszperzitási index (PDI) és a ζ - potenciál értékeket legalább 5-5 mérési eredmény átlagolásával határoztuk meg.

A **transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM)** képeket Dr. Varga Viktória (SZTE TTIK Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék) segítségével egy Jeol JEM-1400plus típusú transzmissziós elektronmikroszkóppal vettük fel 120 keV gyorsítófeszültségen. A **nagyfelbontású transzmissziós elektronmikroszkópos (HRTEM)** képek készítésénél Janóné Dr. Ungor Ditta Anita (SZTE TTIK Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék) segédkezett, ahol egy FEI Tecnai G2 20 X-Twin típusú transzmissziós elektronmikroszkópot alkalmaztunk, 200 kV gyorsítófeszültség beállítása mellett. Az átmérők (d_{TEM}) átlagos értékének meghatározásához ImageJ szoftvert használtunk. A TEM képek segítségével információt kaptunk a részecskék szerkezetéről és az átlagos méretéről, méreteloszlásáról.

4.3.3. Kapszulázási hatékonyság és *in vitro* hatóanyag kioldódási vizsgálatok

Az egyes hordozó makromolekulák kapszulázási hatékonyságának meghatározásához és a hatóanyagok *in vitro* kioldódásának követéséhez **UV-Vis spektrofotometriás** módszert alkalmaztunk. A spektrumokat, illetve a kalibrációs görbéket 200-500 nm hullámhossz tartományon és 1 cm úthosszú kvarc küvettában rögzítettük egy Shimadzu UV-1800 két fényutas spektrofotométer segítségével. A kapszulázási hatékonyság értékét (**EE(%)**) és a részecskék hatóanyag töltöttségét (**DL(%)**) az alábbi **10. és 11. egyenletekkel** határoztuk meg:

$$EE(\%) = \frac{\text{hatóanyag kapszulázott tömege}}{\text{hatóanyag teljes tömege}} \times 100 \quad (10.)$$

$$DL(\%) = \frac{\text{hatóanyag kapszulázott tömege}}{\text{részecskék teljes tömege}} \times 100 \quad (11.)$$

Az *in vitro* kioldódási vizsgálatokat foszfát pufferes (PBS, pH=7,4; 0,9 % NaCl) közegben és féligáteresztő cellulóz dialízis membránnal végeztük el. A cl-M-HyA/KP és M-HyA/CTAB/KP kapcsolatos mérések 25 °C-os, míg a PLA/TP és PLGA/TP esetében 37 °C -os hőmérsékleten történtek. A PLA/PLGA rendszereknél a hidrofób tulajdonsággal rendelkező TP oldhatóságának növelése érdekében a PBS közeg 1 mg/mL koncentrációban PLUR stabilizátort is tartalmazott.

A hatóanyag kioldódás kinetikájának és mechanizmusának meghatározása végett a felvett kioldódási görbékre különböző kinetikai modelleket illesztettük, melyhez egy QtiPlot

0.9.8.9. svn 2288 programot használtunk. A számolások során a szoftver nemlineáris regresszióval minimalizálja a mért és közelítő koncentráció értékek közötti különbségek négyzetösszegét. A modell illesztések után információt kapunk az egyes kinetikai állandókról, a kioldódás mechanizmusát jellemző paraméterek értékéről, az illesztés jóságáról, illetve a standard deviációról. A számolásokat az elsőrendű, Korsmeyer-Peppas, Weibull és Peppas-Shalin modelleknél végeztük el [110–112].

Az *elsőrendű egyenlet* széles körben használják olyan folyamatoknál, ahol a kioldódás csak a hatóanyag koncentrációjától függ. A modell a **12. egyenlettel** írható le:

$$\frac{c_t}{c_0} = e^{-kt} \quad (12.)$$

ahol c_t a hordozó mátrixban lévő hatóanyag koncentrációja t időpillanatban, c_0 a hatóanyag kezdeti koncentrációja a hordozóban és k az elsőrendű kioldódási állandó.

A kioldódási görbék kiértékeléséhez előszeretettel alkalmazzák a *Korsmeyer-Peppas szemi-empirikus egyenletet*. A modell előnye, hogy a polimer mátrix alakját (gömb, film, henger) is figyelembe veszi (**13. egyenlet**):

$$\frac{c_t}{c_0} = k_m t^n \quad (13.)$$

ahol c_t a felszabadult hatóanyag koncentrációja t időpillanatban c_0 a hatóanyag kezdeti koncentrációja a hordozóban, k_m a kinetikai állandó és n a diffúziós-oldódási index, amely a hatóanyag kioldódás mechanizmusát jellemzi.

Ha $n = 0,45$ (gömbi részecskénél 0,42), akkor a kioldódását a diffúzió kontrollálja (Fick diffúzió). Ezzel ellentétben, ha diffúziós-oldódási index értéke $0,45 < n < 1,0$, akkor a kioldódás erózió kontrollált nem -Fick diffúziós folyamat ($n = 1,0$ esetében már csak a Case II. (relaxációs) transzport a domináns).

A *Weibull egyenlet* egy általános empirikus modell, amely szinte minden oldódási görbére alkalmazható. Az egyenlet csak az oldatban lévő hatóanyag mennyiségét veszi figyelembe (**14. egyenlet**):

$$\frac{c_t}{c_0} = 1 - e^{-\left(\frac{t-T}{a}\right)^b} \quad (14.)$$

ahol c_t a kioldódott hatóanyag koncentrációja t időpillanatban, c_0 a felszabadult hatóanyag teljes koncentrációja, T a késleltetési idő a mérés kezdete és a hatóanyag

felszabadulása között (legtöbb esetben $T = 0$), a egy időfüggést leíró skálaparaméter és b az oldódási görbe alakját leíró paraméter (exponenciális: $b = 1$, szigmoid: $b > 1$, parabola: $b < 1$).

A Peppas-Shalin egyenletben külön szerepel a Fick diffúzió és a Case II relaxáció hozzájárulása a kioldódási folyamathoz (**15. egyenlet**):

$$\frac{c_t}{c_0} = k_1 t^m + k_2 t^{2m} \quad (15.)$$

ahol c_t a kioldódott hatóanyag koncentrációja t időpillanatban, c_0 a hatóanyag kezdeti koncentrációja, k_1 a Fick diffúziós hozzájárulás értéke, k_2 a Case II relaxációs hozzájárulás értéke és m a diffúziós kitevő.

A modell alapján az m diffúziós kitevő megadja a kioldódás mechanizmusa (Fick diffúzió: gömb részecskéknél $m = 0,43$; filmeknél $m = 0,50$; henger alaknál $m = 0,45$; Case II (relaxációs) transzport: gömb részecskéknél $m = 0,85$; filmeknél $m = 1,0$; henger alaknál $m = 0,89$; vegyes mechanizmus: gömb részecskéknél $0,43 < m < 0,85$; filmeknél $0,5 < m < 1,0$; henger alaknál $0,45 < m < 0,89$).

4.3.4. Egyéb alkalmazott műszeres technikák

A PLUR cmc értékét **tenziometriás** mérésekkel határoztuk meg. A vizsgálatokat egy automatizált, számítógép kontrollált és LabDesk® szoftverrel működő KRÜSS K100MK2 típusú univerzális felületi feszültségmérő készülékkel végeztük el $25 \pm 0,1$ °C hőmérsékleten. A tenziometriás mérések során egy csiszolatlan optimálisan 0° ($\cos\theta = 1$) Milli-Q vízzel szembeni nedvesedési szöggel rendelkező platina lemezt (Wilhelmy lemezes módszer) felhasználva szemiempirikusan kiszámolhatjuk a felületi feszültséget a **16. egyenlet** alapján:

$$\gamma = \frac{F}{L \cos\theta} \quad (16.)$$

ahol γ a felületi feszültség, F a lemez kihúzásakor mért erő, L a lemez kerülete és θ a peremszög (esetünkben 0°). A vizsgálatok alatt a platina lemezt 50 mL térfogatú, 1,6 mM koncentrációjú PLUR oldatba merítettük, majd az oldatot az alkalmazott közegtől függően 10 mL össztérfogatú nagy tisztaságú Milli-Q vízzel vagy PBS oldattal 40 lépésben titráltuk. A titrálás a műszerhez tartozó automata bürettával történt. A felületi feszültség értékeket legalább 5-5 mérés átlagából határoztuk meg.

Az FT-IR, DSC, TG, DTA és *in vitro* kioldódási méréseknél felhasznált pormintákat fagyasztva szárítással (liofilizálással) állítottuk elő. Közvetlen az eljárás megkezdése előtt

a mintákat cseppenként lefagyasztottuk folyékony nitrogénnel lehűtött üvegben. Az oldószert 4 mbar nyomáson egy Christ Alpha 1-2 LD típusú fagyasztva szárító berendezéssel távolítottuk el. A PLA/PLGA részecskék esetében a minták fagyasztását -80 °C és -20 °C hőmérsékletű mélyhűtőben is elvégeztük.

Az egyes oldatok és pufferek pontos pH értékét hidrogénion-szelektív üvegelektróddal felszerelt Mettler-Toledo FiveEasyTM műszerrel határoztuk meg.

5. Eredmények

5.1. A szintetizált PLA/PLGA polimerek karakterizálása és az előállított PLA/PLGA részecskék jellemzése az oldószer, stabilizátor és hidrofilitási tulajdonságok függvényében

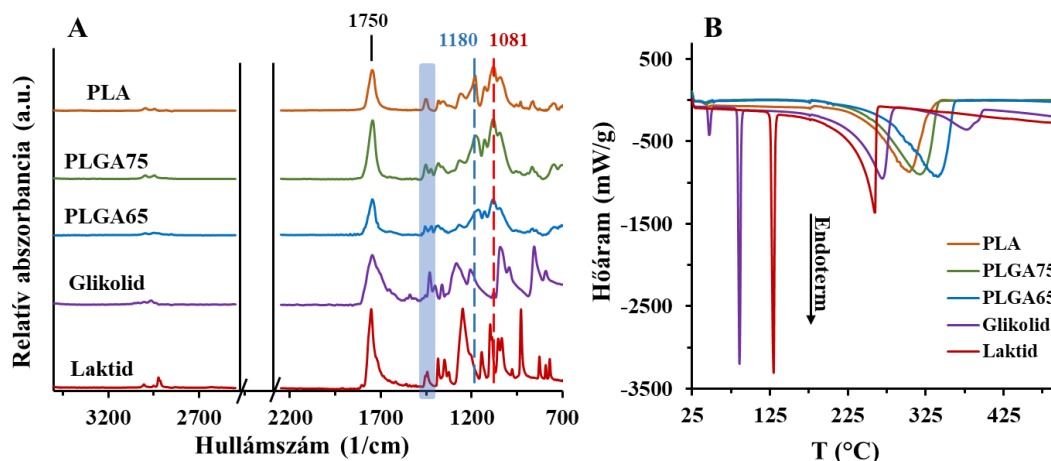
5.1.1. A szintetizált PLA és PLGA polimerek karakterizálása

Doktori munkám első lépéseként PLA/PLGA polimereket állítottunk elő gyűrűfelnýtásos polimerizációs eljárással. A szintézist követően a kész termékek karakterizálására FT-IR spektroszkópiás vizsgálatokat végeztünk (**11.A. ábra**). A spektrumokon jól látható, hogy 1750 cm^{-1} -nél a laktidra és a glikolidra is jellemző C=O kettős kötés rezgési sávja mindegyik minta esetén megfigyelhető. Az ujjlenyomat tartományban ($\nu \leq 1500\text{ cm}^{-1}$) 1180 cm^{-1} (kék szaggatott vonal) és 1080 cm^{-1} (piros szaggatott vonal) hullámszámoknál megjelenő rezgési sávok a polimerekre jellemző C-O észter kötésekhez rendelhetőek. A rögzített IR spektrumok az irodalmi adatokkal jó egyezésben vannak, így kijelenthetjük, hogy a ROP szintézis sikeresen végbement [81,82]. Az 1424 cm^{-1} -nél a glikolid CH_2 -re és a 1453 cm^{-1} -nél a laktid CH_3 csoportjának változására érzékeny rezgési sávokat (kék sávval jelölt) felhasználva, a csúcsok alatti integrál értékek arányából meghatároztuk a PLGA kopolimerekben lévő monomer arányokat. A számolásokhoz a **17. és 18. egyenleteket** alkalmaztuk:

$$\text{d,l-tejsav monomer (\%)} = \frac{\text{CH}_3 \text{ integrál értéke}}{\text{CH}_3 \text{ integrál értéke} + \text{CH}_2 \text{ integrál értéke}} \times 100 \quad (17.)$$

$$\text{glikolsav monomer (\%)} = \frac{\text{CH}_2 \text{ integrál értéke}}{\text{CH}_3 \text{ integrál értéke} + \text{CH}_2 \text{ integrál értéke}} \times 100 \quad (18.)$$

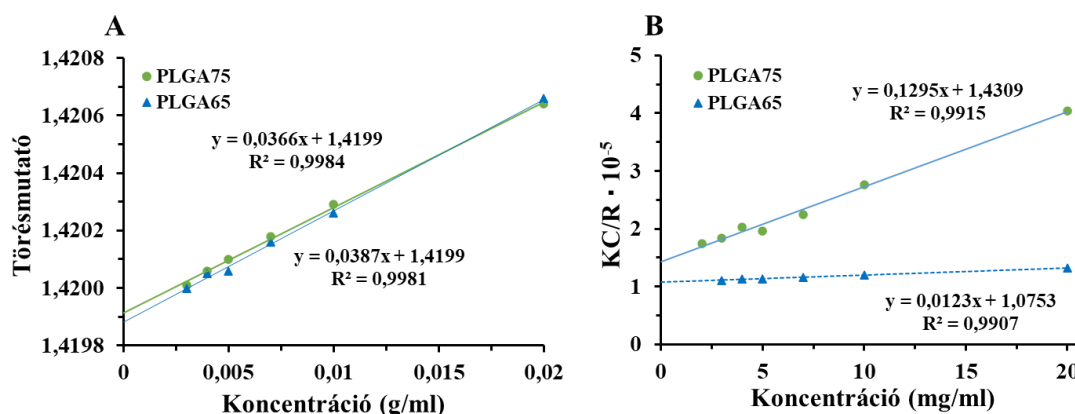
A számolt százalékos értékek alapján a PLGA65 $62 \pm 5\%$ laktid és $38 \pm 6\%$ glikolid, míg a PLGA75 $73 \pm 4\%$ laktid és $27 \pm 3\%$ glikolid monomerből épül fel, melyek a nominális 65% és 75% laktid tartalom értékekkel közel megegyeznek. A polimerek termikus sajátságait, az üvegesedési ($T_{g,\text{max}}$) és a degradációs ($T_{d,\text{max}}$) hőmérsékletét DSC mérésekkel határoztuk meg (**11.B. ábra**). Referenciaként a kereskedelemben kapható PLA/PLGA polimerek, a laktid és a glikolid termikus tulajdonságait is megvizsgáltuk.



11. ábra: A PLA/PLGA polimerek és a ciklikus dimerek (A) FT-IR spektrumai és (B) DSC görbéi

A laktid 130 °C (olvadáspont) és 260 °C (degradációs hőmérséklet), illetve a glikolid 86 °C (olvadáspont) és 269 °C hőmérséklet értékeknél (degradációs hőmérséklet) megjelenő karakterisztikus endoterm csúcsai az egyes polimerek DSC görbéin nem figyelhetők meg, ami arra utal, hogy számottevő mennyiségű szabad monomer nincs jelen a mintáinkban. A DSC görbéken megfigyelhető degradációs hőmérsékletek a PLA -tól kezdve ($T_{d,max} = 304$ °C) fokozatosan növekvő értéket mutatnak a kopolimerekben jelenlévő glikolid mennyiségének növelésével ($T_{d,max} = 317$ °C (PLGA75), $T_{d,max} = 341$ °C (PLGA65)), amit feltételezhetően a makromolekulás láncban lévő hidrofíl részek között megnövekedő intermolekuláris kölcsönhatások okoznak. A kereskedelembe kapható és az általunk szintetizált PLA/PLGA termikus sajátságai jelentős eltérést nem mutatnak (**2. táblázat**). A meghatározott üvegesedési hőmérsékletek 42 °C (PLGA65), 45 °C (PLGA75), 46 °C (PLA) értékeknek adódtak. Korábban G. Reich és kutatócsoportja a PLA/PLGA mikrorészecskék degradációs sajátságait vizsgálta PBS pufferben. Az általa, ugyanezen polimerekre, meghatározott üvegesedési hőmérsékletek az általunk mért értékekkel jó egyezést mutat (PLA ($M_w = 14500$ Da): $T_g = 48,2$ °C, PLGA75 ($M_w = 66800$ Da): $T_g = 47,6$ °C) [113].

Jól ismert, hogy a polimer alapú részecskék méretét jelentősen befolyásolja az egyes polimerek molekulatömege, mivel a nagyobb makromolekulák felhasználásával lényegesen nagyobb részecskék képződhetnek [84]. A polimerek jellemzéséhez hozzájárulva meghatároztuk az általunk előállított polimerek átlagos molekulatömegét is, amit 0-20 mg/mL 1,4-dioxános polimer oldatok DLS módszerrel történő vizsgálataiból definiáltunk (**12. ábra**). A Rayleigh-Gans-Debye modellel (**1. egyenlet**) meghatározott molekulatömegek és a második viriál együttható értékeit a **2. táblázatban** összesítettük.



12. ábra: (A) A PLGA65 és a PLGA75 kopolimerek törésmutató értékei a koncentráció függvényében és (B) a Rayleigh-Gans-Debye egyenlet (1. egyenlet) grafikus ábrázolása

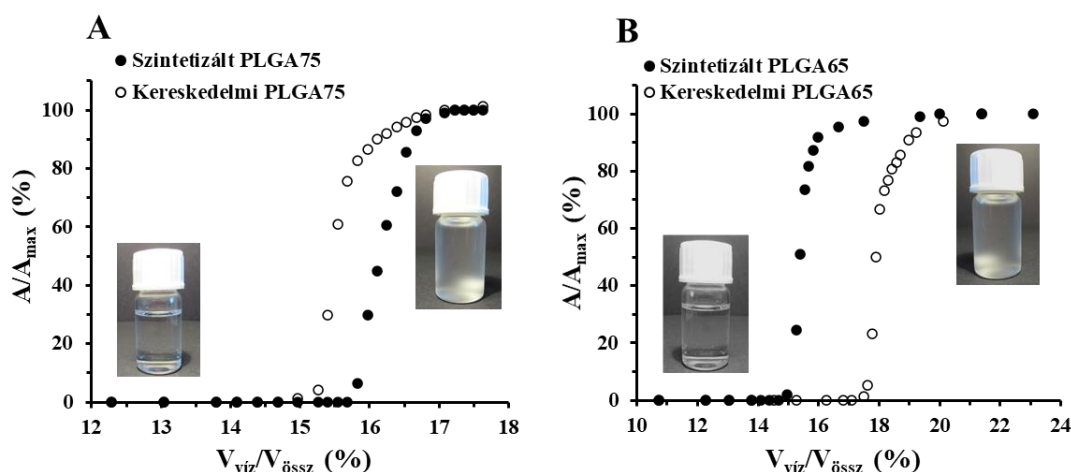
2. táblázat: A DSC és a DLS mérésekkel meghatározott üvegesedési hőmérséklet ($T_{g,max}$), degradációs hőmérséklet ($T_{d,max}$), átlagos molekulatömeg és második viriál együttható értékek a szintetizált, illetve a kereskedelmi forgalomban kapható PLA/PLGA esetén

	polimer	$T_{g,max}$ (C°)	$T_{d,max}$ (C°)	M_w (Da)	A_2 (mL · mol/g ²)
szintetizált	PLGA65	42	341	93000 ± 1000	6,15E-05 ± 5,17E-06
	PLGA75	45	317	69900 ± 4000	6,48E-04 ± 3,80E-05
	PLA	46	304	72200 ± 15000	2,70E-04 ± 3,29E-04
kereskedelmi	PLGA65 [#]	40	340	40000 – 75000	—
	PLGA75 [#]	44	315	66000 – 104000	—
	PLA [#]	33	302	≈ 250000	—

[#] a molekulatömeg értékek a Sigma-Aldrich anyagbiztonsági adatlapja szerint

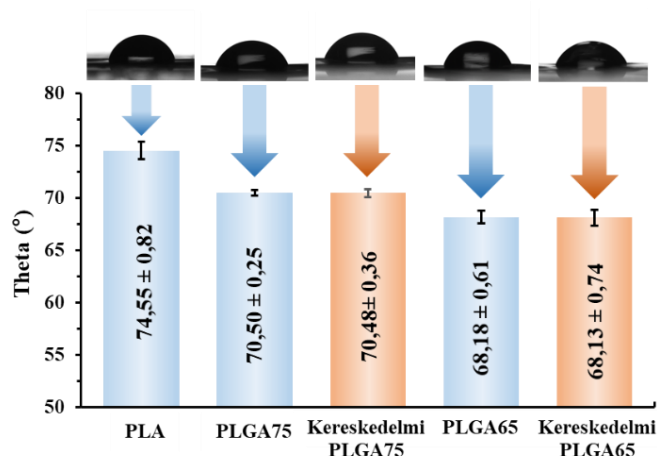
A vizsgálatok előtt meghatározott törésmutató értékek koncentráció függése (12.A. ábra) esetében az illesztett egyenesek nagy hasonlóságot mutatnak. A DLS mérések révén kapott eredményeink alapján, az irodalomban ROP módszerrel előállított PLA/PLGA származékokhoz képest, viszonylag alacsony, $M_w < 100$ kDa alatti molekulatömegű polimereket állítottunk elő [114], amelyek közül a legnagyobb molekulatömeggel a PLGA65 rendelkezik (92000 ± 1000 Da). A Rayleigh-Gans-Debye modellel meghatározott második viriál együttható a vizsgált 1,4-dioxános közegben a PLGA65 esetében a legkisebb, ami megerősíti, hogy a vártak megfelelően a leghidrofilebb sajátsággal a PLGA65 rendelkezik.

Az átlagos molekulatömeg értékek DLS technikával történő meghatározása mellett a polimerek méreteloszlásának igazolására turbidimetriás méréseket is végeztünk (**13. ábra**). A precipitációs titrálások során a PLGA kopolimereket 1,4-dioxánban oldottuk, majd kicsapószerként nagy tisztaságú Milli-Q vizet használtunk. A **13. ábrán** látható görbék alapján a PLGA75 esetében $V_{\text{víz}}/V_{\text{össz}} = 15,7\%$, míg a PLGA65-tartalmú mintáknál $V_{\text{víz}}/V_{\text{össz}} = 14,6\%$ víztartalom esetén indul a csapadékképződés. A kereskedelembe kapható polimereknél ugyanezen értékek: $V_{\text{víz}}/V_{\text{össz}} = 14,7\%$ (PLGA75; $M_w = (66000-104000)$ Da) és $V_{\text{víz}}/V_{\text{össz}} = 17,1\%$ (PLGA65; $M_w = (40000-75000)$ Da). Megállapíthatjuk tehát, hogy az általunk szintetizált PLGA75 kisebb, míg a PLGA65 nagyobb átlagos molekulatömeggel rendelkezik a referenciaként alkalmazott polimerekhez képest, mely jó egyezésben van a DLS méréseknél kapott eredményeinkkel. A titrálási görbék lefutása a szintetizált polimereknél meredekebben változik, ami alátámasztja, hogy az általunk előállított PLA/PLGA polimerek szűkebb molekulatömeg eloszlással bírnak, mely kedvező monodiszperz kolloid részecskék méretszabályozott előállításához.



13. ábra: 1,4-dioxánban oldott (A) PLGA75 és (B) PLGA65 precipitációs görbéi
(titrálószer: Milli-Q víz, titrálendő oldat: $V = 5$ mL, $c_{\text{PLGA}} = 5$ mg/mL)

A különböző laktid:glikolid arányú polimerek hidrofilitásának összehasonlítása érdekében peremszög vizsgálatokat végeztünk el. A polimer felületeken felvett peremszög értékeket és a cseppekről készült képeket a **14. ábrán** mutatjuk be.



14. ábra: A PLA/PLGA polimerek peremszög értékei a felületre cseppentett 10 - 10 μ L térfogatú vízcseppekre meghatározva

A meghatározott peremszögek a PLA makromolekulától kezdve fokozatosan csökken $\sim 74,5^\circ$ -től (PLA) $\sim 68,2^\circ$ -ig (PLGA65) a glikolid mennyiségének növekedésével, ami igazolja, hogy a szintetizált polimerek hidrofilitása szisztematikusan változik a laktid:glikolid aránnyal. A mérések során a kereskedelmi forgalomban kapható PLGA75 és 65 nedvesedési tulajdonságait is meghatároztuk, ahol a PLGA75 esetén $70,48 \pm 0,36^\circ$ és PLGA65 vonatkozásában $68,13 \pm 0,74^\circ$ értékeket kaptunk. Az eredményeket összevetve megállapítható, hogy az általunk előállított szűkebb méreteloszlású és kissé eltérő molekulatömegű polimerek a kereskedelmi forgalomban kaphatókkal tökéletesen megegyező nedvesedési tulajdonságokkal rendelkeznek.

5.1.2. Hatóanyag nélküli PLA/PLGA részecskék jellemzése

Az előállított PLA, PLGA65 és PLGA75 polimerek karakterizálása után nanoprecipitációs módszerrel kíséreltünk meg a polimerekből kolloid részecskéket előállítani. Ahogy az Irodalmi áttekintésben részleteztük, elhanyagolható azon irodalmi hivatkozások száma, melyek az alkalmazott oldószer, a stabilizátor és az eltérő hidrofilitású polimerek együttes hatását elemzik a részecskék szabályozható előállítására vonatkozóan. Vizsgálatainkkal ezen hatások tanulmányozását kívántuk értelmezni. Első lépésben a képződő részecskék méretét határoztuk meg fényszórás mérésekkel (**3. táblázat**). Az eredményekből jól látható, hogy függetlenül az alkalmazott stabilizátor típusától és a szerves oldószer jellegétől, a hidrofilebb karakterű polimerek alkalmazása esetén mindig kisebb részecskeméret érhető el.

3. táblázat: Nanoprecipitációs eljárással előállított PLA/PLGA részecskék DLS módszerrel meghatározott hidrodinamikai átmérő (d_{DLS}) és polidiszperzitási index (PI) értékei

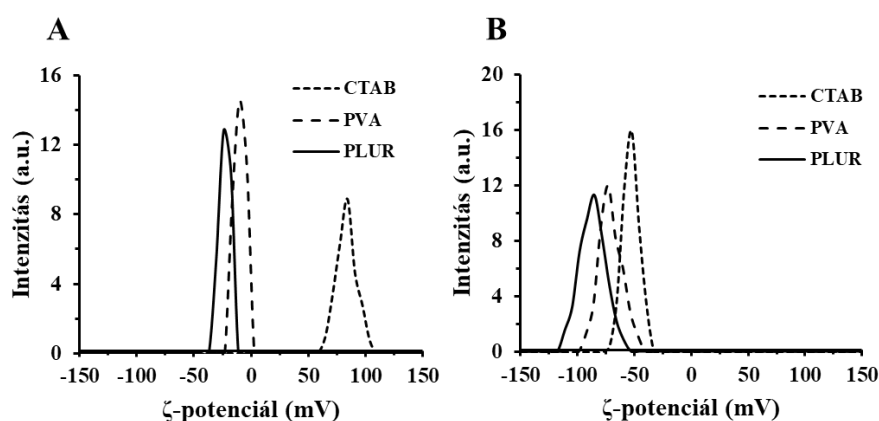
	polimer	CTAB		PVA		Pluronic F127	
		PI	$d_{DLS} \pm SD^{\#}$ (nm)	PI	$d_{DLS} \pm SD^{\#}$ (nm)	PI	$d_{DLS} \pm SD^{\#}$ (nm)
aceton	PLGA65	$0,65 \pm 0,05$	228 ± 18	$0,16 \pm 0,07$	211 ± 28	$0,11 \pm 0,07$	186 ± 32
	PLGA75	$0,47 \pm 0,02$	261 ± 16	$0,06 \pm 0,04$	221 ± 63	$0,10 \pm 0,01$	180 ± 33
	PLA	$0,56 \pm 0,10$	355 ± 27	$0,17 \pm 0,03$	243 ± 72	$0,05 \pm 0,05$	190 ± 44
1,4 dioxán	PLGA65	$0,57 \pm 0,08$	239 ± 27	$0,08 \pm 0,03$	260 ± 57	$0,17 \pm 0,04$	232 ± 64
	PLGA75	$0,48 \pm 0,04$	266 ± 23	$0,09 \pm 0,05$	268 ± 51	$0,09 \pm 0,02$	236 ± 53
	PLA	$0,57 \pm 0,03$	381 ± 36	$0,13 \pm 0,06$	271 ± 58	$0,09 \pm 0,04$	260 ± 61

A csúcsmaximum kísérleti hibája 2,5 % alatti

A felhasznált szerves oldószereket összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy az acetonhoz ($T_f = 56\text{ °C}$; $\gamma = 25,2\text{ mN/m}$ (20 °C); $\rho = 0,784\text{ g/cm}^3$) képest a magasabb sűrűséggel, felületi feszültséggel és forrásponttal rendelkező 1,4-dioxán esetén ($T_f = 101\text{ °C}$; $\gamma = 33,0\text{ mN/m}$ (20 °C); $\rho = 1,03\text{ g/cm}^3$) átlagosan 10-70 nm -rel nagyobb hidrodinamikai átmérővel rendelkező részecskék képződnek, amelyek közül a legkisebb mérettel a PLGA65 polimer és PLUR stabilizátor együttes alkalmazása mellett előállított részecskék rendelkeznek ($d_{DLS} = 232\text{ nm}$). A stabilizátorok hatását tanulmányozva a legnagyobb részecskeméret és polidiszperzitási index értékeket a pozitív töltésű CTAB esetén, míg a legkisebb részecske méretet a PLUR stabilizátor és aceton oldószer alkalmazásával értük el ($d_{DLS} \approx 186\text{ nm}$ (PLGA65), $d_{DLS} \approx 180\text{ nm}$ (PLGA75), $d_{DLS} \approx 190\text{ nm}$ (PLA)). A PVA felhasználásával előállított rendszerek polidiszperzitása a PLUR-tartalmú mintákkal összevethető, viszont a nagyobb molekulatömegnek köszönhetően (PVA: $M_w \sim 72000\text{ Da}$, PLUR: $M_w \sim 12600\text{ Da}$) a részecskék hidrodinamikai átmérője nagyobb lesz. Ezek alapján kijelenthető, hogy a stabilizátorok töltése és molekulatömege a PLA/PLGA alapú részecskék méretét és polidiszperzitását jelentősen befolyásolja.

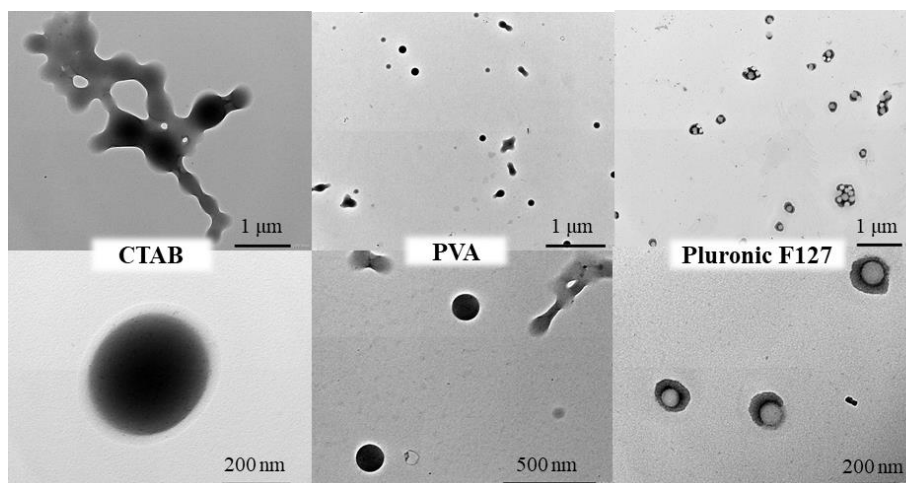
A részecskék stabilitásának meghatározásához ζ -potenciál méréseket is végeztünk. Első lépésben az aceton közegű és különböző stabilizátorokkal elkészített PLGA75 alapú kolloid részecskéket ζ -potenciál értékeit értelmeztük (**15. ábra**). A méréseket tisztítás előtt és után is elvégeztük. A tisztítás előtti mintáknál átlagosan $\zeta = 82,3 \pm 1,4\text{ mV}$ (CTAB), $\zeta = -11,3 \pm 2,7\text{ mV}$ (PVA) és $\zeta = -22,4 \pm 1,5\text{ mV}$ (PLUR), míg a tisztítás után $\zeta = -53,4 \pm 0,7\text{ mV}$

(CTAB), $\zeta = -72,3 \pm 0,6$ mV (PVA) és $\zeta = -87,6 \pm 1,9$ mV (PLUR) értékeket kaptunk. Megállapíthatjuk, hogy a feleslegben lévő stabilizátorok eltávolítása elengedhetetlen a megfelelő kolloid stabilitással rendelkező gyógyszerhordozó rendszerek előállításához. A **15.B. ábrán** látható, hogy a legnagyobb stabilitás a PLUR alkalmazása esetén figyelhető meg. A kísérletsorozat következő lépésében a PLUR stabilizátor és acetonos oldószer alkalmazásánál előállított PLA/PLGA részecskék ζ -potenciál értékét is elemeztük. A ζ -potenciál értékek tisztítás előtt $\zeta = -21,4 \pm 1,1$ mV (PLGA65), $\zeta = -22,4 \pm 1,5$ mV (PLGA75) és $\zeta = -23,1 \pm 2,0$ mV (PLA) értéknek, míg tisztítás után $\zeta = -85,7 \pm 1,8$ mV (PLA65), $\zeta = -87,6 \pm 1,9$ mV (PLGA75) és $\zeta = -82,2 \pm 1,2$ mV (PLA) adódtak. A PLA/PLGA részecskék között jelentős változás nem figyelhető meg, tehát a laktid:glikolid arányok szisztematikus változtatásával kialakított eltérő hidrofilítási tulajdonságok a részecskék stabilitására meghatározó hatással nem bírnak.



15. ábra: A különböző stabilizátorok mellett előállított PLGA75 részecskék reprezentatív ζ -potenciál értékei tisztítás **(A)** előtt és **(B)** után (*szerves fázis:* $V = 1,5$ mL, $c_{\text{PLGA75}} = 10$ mg/mL, *vizes fázis:* $V = 15$ mL, $c_{\text{stabilizátor}} = 0,1$ mg/mL)

A kialakuló részecskék morfológiáját, méretét/méreteloszlását és szerkezetét TEM felvételekkel határoztuk meg. A **16. ábra** példaként a PLA alapú részecskék elektronmikroszkópos képeit mutatja mindhárom stabilizátor alkalmazása esetén. A TEM képek alapján megállapítható, hogy a CTAB esetén nagyméretű részecskék mellett aggregátumok is képződnek, melyet a részecskék stabilitás vizsgálatakor meghatározott ζ -potenciál értékek is alátámasztanak. A felvételeken jól látható, hogy a PVA és PLUR alkalmazásával a részecskék mérettartománya PVA: 220 ± 40 nm, PLUR: 170 ± 24 nm között változik, melyek közül a PLUR esetében figyelhető meg monodiszperzebb rendszer képződése.



16. ábra: Különböző stabilizátorok felhasználásával előállított PLA részecskék reprezentatív TEM felvételei eltérő nagyítások mellett (*szerves fázis:* aceton, $c_{PLA} = 10$ mg/mL, $V = 1,5$ mL, *vizes fázis:* $c_{stabilizátor} = 0,1$ mg/mL, $V = 15$ mL)

5.1.3. Hatóanyag-tartalmú PLA/PLGA részecskék jellemzése

A továbbiakban az előző fejezetben jellemzett aceton/víz alkalmazása mellett PLUR stabilizátorral előállított PLA/PLGA75/PLGA65 részecskék kapszulázási tulajdonságait térképeztük fel különböző hidrofilitási tulajdonsággal rendelkező (modell)hatóanyagok (TPGS, KP, TP) felhasználásával. A TP a nyolc különböző szerkezetű E- vitamin származék közül biológiailag a legaktívabb [115,116], melyet antioxidáns jellege alkalmassá teszi oxidatív stressz hatásainak csökkentésére elősegítve a szív és érrendszeri betegségek, rák vagy érelmeszesedés megelőzését. Ennek egy hidrofilebb, észteres származéka a stabilizátorként is alkalmazható TPGS. A KP egy elterjedten alkalmazott nem-szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerszármazék [117]. A kísérleti körülményekben részletezett előállítási protokollok alapján a képződő részecskék méretét és méreteloszlási tulajdonságait tanulmányoztuk első lépésben. A méreteloszlási görbék alapján megállapítottuk, hogy a hatóanyagok hidrofilitás csökkenésével (TPGS>KP>TP) a részecskék hidrodinamikai átmérője szisztematikusan nő (**M46. ábra, 4. táblázat**). Ezzel ellentétben ugyanazon hatóanyag esetén a polimerek laktid:glikolid arányának változtatása nincs számottevő hatással a méretre. A hatóanyag nélküli minták monodiszperzebb méreteloszlással rendelkeznek, mint a hatóanyag-tartalmúak.

A hatóanyag-tartalmú részecskék stabilitását is tanulmányoztuk a tisztítási lépések előtt és után. Megállapítottuk, hogy a hatóanyag jelenléte nem változtatja meg a mért ζ -potenciál értékeket. A mérésekkel alapján a tisztítás mindenképpen elengedhetetlen a részecskék megfelelő stabilitásának eléréséhez, melyet a példaként bemutatott PLGA75

alapú részecskék ζ -potenciál értékei is alátámasztanak (*tisztítás előtt*: $\zeta = -22,4 \pm 1,5$ mV (hatóanyag nélkül) $\zeta = -19,6 \pm 1,1$ mV (TPGS), $\zeta = -19,4 \pm 2,8$ mV (KP) és $\zeta = -24,0 \pm 0,7$ mV (TP), *tisztítás után* $\zeta = -87,6 \pm 1,9$ mV (hatóanyag nélkül), $\zeta = -87,5 \pm 3,0$ mV (TPGS), $\zeta = -62,5 \pm 2,1$ mV (KP) és $\zeta = -62,0 \pm 2,5$ mV (TP)). A legnagyobb ζ -potenciál érték a TPGS esetén figyelhető meg, míg a legrosszabb vízdékonyságú vegyületeket tartalmazó részecskék esetén a mért értékek kisebbnek adódnak, mely eltérő szerkezetű részecskék képződésére utalhat.

4. táblázat: A PLUR -stabilizált hatóanyag-tartalmú PLA /PLGA részecskék átlagos részecske átmérői, a polidiszperzitási indexek és a kapszulázási hatékonyságok

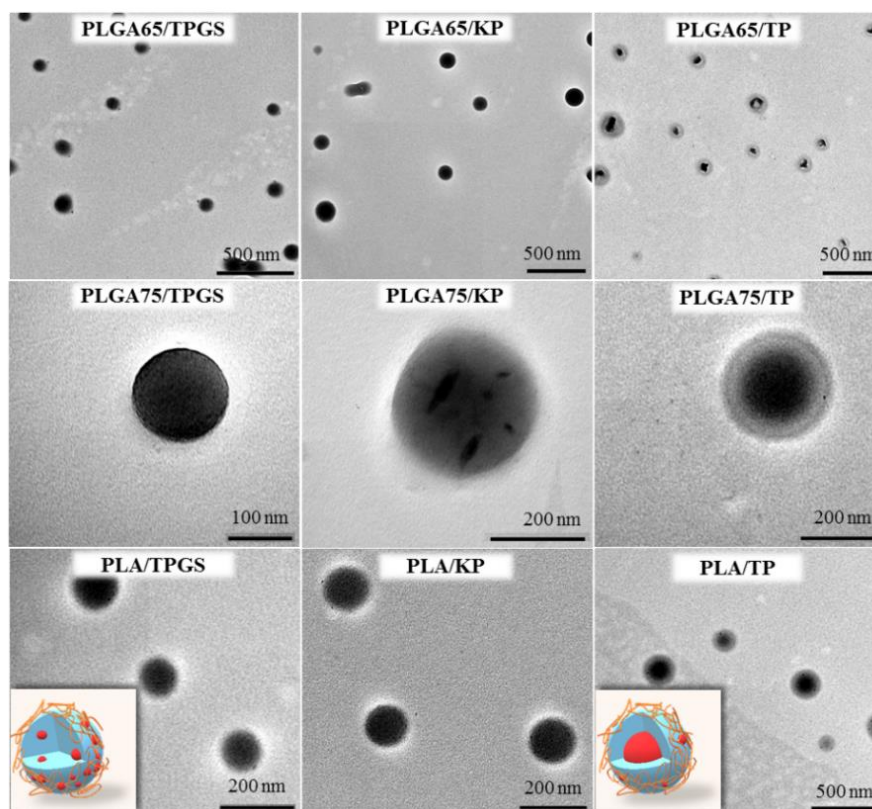
polimer	hatóanyag	PI	$d_{DLS} \pm SD^{\#}$ (nm)	$d_{TEM} \pm SD$ (nm)	EE (%)	DL (%)
PLGA65	—	$0,11 \pm 0,07$	186 ± 32	164 ± 51	—	—
	TPGS	$0,12 \pm 0,03$	178 ± 48	159 ± 63	11,34	3,78
	KP	$0,14 \pm 0,04$	216 ± 62	204 ± 71	13,21	4,40
	TP	$0,23 \pm 0,03$	253 ± 52	238 ± 59	88,25	29,41
PLGA75	—	$0,10 \pm 0,01$	180 ± 33	172 ± 49	—	—
	TPGS	$0,07 \pm 0,04$	173 ± 47	160 ± 56	6,39	2,13
	KP	$0,07 \pm 0,01$	207 ± 42	193 ± 69	7,91	2,64
	TP	$0,19 \pm 0,05$	257 ± 75	238 ± 62	90,28	30,09
PLA	—	$0,05 \pm 0,05$	190 ± 36	183 ± 57	—	—
	TPGS	$0,13 \pm 0,05$	195 ± 64	190 ± 76	6,88	2,29
	KP	$0,09 \pm 0,06$	225 ± 48	211 ± 64	11,29	3,76
	TP	$0,12 \pm 0,05$	257 ± 73	236 ± 77	69,07	23,02

A csúcsmaximum kísérleti hibája 4 % alatti

A részecskék szerkezetét és méretét a rögzített TEM képek alapján is meghatároztuk (**17. ábra**). Az elektronmikroszkópos felvételekről meghatározott átlagos átmérők a hidrodinamikai átmérőkhöz képest 10-20 nm -rel kisebb értéket mutattak, mely a vártnak megfelelő. A DLS mérésekkel összhangban a legnagyobb részecskeméretet itt is a TP-tartalmú PLA/PLGA részecskéknél határoztuk meg.

A rögzített TEM felvételeket tanulmányozva egyértelműen kijelenthető, hogy míg a TPGS- és a KP- tartalmú részecskéknél homogén, addig a TP alkalmazása esetén egy jól definiált mag-héj struktúra kialakulása fedezhető fel, amelyet a polimerekben lévő laktid:glikolid arányok változtatása jelentős mértékben nem befolyásol. A mag-héj szerkezet előnye, hogy ily módon a TP kioldódása kontrollálhatóbbá válik, mindezek mellett

biohasznosulása és stabilitása is megnő, ami a lipofil gyógyszerészarmazékoknál nagy szereppel bírhat [118]. A részecskék szerkezeti sajátosságait nézve a nanoprecipitációnál a mag-héj szerkezet kialakulása csak nagyon hidrofób hatóanyagok esetében valósulhat meg (KP : $\log P = 2,71$ [119]; TP : $\log P = 12,2$ [120]), ahol lehetőség adódik a polimer láncok hidrofób részeinek hatóanyag körüli csoportosulására. Hidrofilebb gyógyszerészarmazékoknál, esetünkben a KP , a precipitáció mértéke (pl. a kicsapódott hatóanyag mennyisége) jelentősen eltérhet, ami csökkenti a fentebb említett mag-héj struktúra kialakulásának lehetőségét.



17. ábra: Nanoprecipitációs eljárással előállított, hatóanyag-tartalmú PLA és PLGA részecskék TEM képei és a feltételezhető szerkezet sematikus (nem méretarányos) ábrái (*szerves fázis*: $C_{PLA/PLGA} = 10 \text{ mg/mL}$, $V = 1,5 \text{ mL}$; *vizes fázis*: $C_{PLUR} = 0,1 \text{ mg/mL}$, $V = 15 \text{ mL}$; $m_{\text{hatóanyag}} = 7,5 \text{ mg}$)

A kapszulázási hatékonyságok meghatározását spektrofotometriás módszer segítségével kiviteleztek. A részecskékbe juttatott hatóanyag mennyiségeket a **M47. ábráján** látható kalibrációs egyenesek alapján állapítottuk meg. A PLA/PLGA kapszulázási hatékonyságát megvizsgálva a legkisebb értéket a TPGS esetén (6-11 %), míg a legnagyobbat a TP vonatkozásában (70-90 %) értük el (**4. táblázat**). A TP hatóagnál

megfigyelt kimagasló kapszulázási hatékonyságnak köszönhető a korábban megállapított nagymértékű részecskeméret növekedés is. A nanoprecipitációs módszernél a hidrofób hatóanyagok PLGA mátrixba történő juttatása nagyobb hatékonysággal valósítható meg [89], amit esetünkben a TP és a PLA/PLGA erős hidrofób jellege tovább erősít. A KP vonatkozásában, a kezdetben vizes fázisban oldott TPGS vegyülethez hasonlóan, alacsony hatóanyag bevitelt figyeltünk meg. Ebben az esetben az említett hatóanyagok nagyrésze feltételezhetően főleg a részecskék felületén homogénen helyezkedik el, amit a ζ -potenciál értékek is megerősítenek (**17. ábra, sematikus kép**). A PLA/PLGA hordozókat nézve egyértelműen kijelenthető, hogy a hidrofilebb hordozók a TP hatóanyagnál nagyobb kapszulázási hatékonysággal rendelkeznek, így a glikolid arányának növelésével a hatóanyag hordozóba való vitele tovább növelhető. Ennek legfőbb oka lehet, hogy a hidrofilítás változásával a polimerek kicsapódási folyamatai is lassulhatnak, ami elősegítheti a TP mag kialakulásának lehetőségét, így a kapszulázási hatékonyság növekedését.

5.2. Mag-héj szerkezetű TP-tartalmú PLA/PLGA részecskék előállítási protokolljának optimalizálása és szerkezeti jellemzésük

5.2.1. Nanoprecipitációs technikával előállított TP- tartalmú PLA/PLGA részecskék koncentráció függő előállítási protokolljának optimalizálása

A hidrofób TP kapszulázásával foglalkozó tudományos publikációkban nagyrészt emulziós-oldószer elpárologtatáson alapuló módszert használnak a nevezett hatóanyag polimer alapú mátrixba viteléhez [116,121–124], amely esetben csak homogén részecske szerkezet kialakulása figyelhető meg. A mérések során alkalmazott polimerek, hatóanyag és stabilizátor koncentrációjának befolyását kevésbé vizsgálták. C. Quintero és munkatársai poli(*N*-izopropil-akrilamid)-poli(ϵ -kaprolakton)- poli(*N*-izopropil-akrilamid) (PNIPAM-*b*-PCL-*b*-PNIPAM) triblokk kopolimerekbe kapszuláztak már TP molekulákat nanoprecipitációs módszerrel mag-héj struktúra kialakulása mellett, ahol azonban főként a hőmérséklet és a kopolimert felépítő monomerek molarányainak a részecskék méretére, hőérzékeny viselkedésére, szerkezetére és a hatóanyag kioldódásra gyakorolt hatását tanulmányozták [125]. Mindezek függvényében, további munkánk során a nanoprecipitációs módszerrel előállított PLA/PLGA alapú TP-tartalmú mag-héj struktúrával rendelkező részecskék sajátosságainak (méret, szerkezet, kapszulázási hatékonyság stb.) változását határoztuk meg a komponens koncentrációk szisztematikus változtatásának függvényében, hogy átfogó képet kapjunk a jól definiált mag-héj szerkezet kialakulásának feltételeiről.

Ehhez az 5.1.3. alfejezetben már ismertetett TP- tartalmú PLA alapú részecskék előállítási protokollját optimalizáltuk. Az **5. táblázat** jól összefoglalja, hogy a hordozó, a stabilizátor és a hatóanyag vonatkozásában milyen koncentráció értékek beállítása mellett végeztük el reprodukciós módon a részecskék előállítását nanoprecipitációs módszerrel. A komponens koncentrációk részecskék méretére és szerkezetére gyakorolt hatásának követése érdekében a koncentrációk közül minden esetben csak egy paramétert változtattunk. A kapszulázási hatékonyság értékeit a **M47.C. ábrája** alapján állapítottuk meg. A PLA koncentráció függésével kapcsolatos vizsgálatok eredményeként megállapítható, hogy a részecskék hidrodinamikai átmérője ~ 120 nm -től ($C_{PLA} = 1,25$ mg/mL) ~ 200 nm -ig ($C_{PLA} = 10$ mg/mL) szisztematikusan nő.

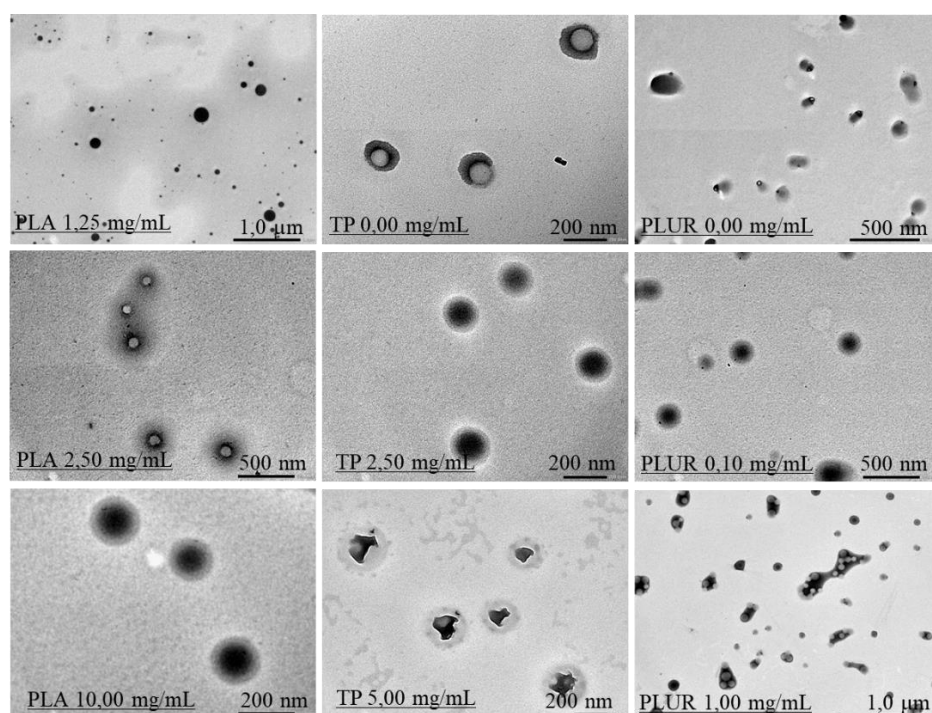
5. táblázat: Nanoprecipitációval előállított TP-tartalmú PLA részecskék átlagos részecske átmérő értékei, a polidiszperzitási indexek (PI), valamint a EE(%) és DL(%) értékek az alkalmazott kezdeti koncentrációk esetében

Minta	Acetonos Fázis		Vizes Fázis		$d_{DLS} \pm SD^{\#}$ (nm)	PI $\pm SD$	EE (%)	DL (%)
	C_{PLA} (mg/mL)	C_{TP} (mg/mL)	C_{PLUR} (mg/mL)					
PLA koncentráció függés	1,25	2,5	0,1		120 \pm 33	0,120 \pm 0,04	–	–
	2,5	2,5	0,1		156 \pm 28	0,039 \pm 0,01	–	–
	5,0	2,5	0,1		179 \pm 35	0,082 \pm 0,04	–	–
	10,0	2,5	0,1		201 \pm 38	0,095 \pm 0,02	69,11	14,7
TP koncentráció függés	10,0	0	0,1		188 \pm 37	0,092 \pm 0,05	–	–
	10,0	0,5	0,1		189 \pm 34	0,048 \pm 0,02	91,28	4,36
	10,0	1,0	0,1		192 \pm 30	0,062 \pm 0,03	75,61	7,02
	10,0	2,5	0,1		201 \pm 38	0,095 \pm 0,02	69,11	14,7
	10,0	5,0	0,1		252 \pm 53	0,073 \pm 0,03	66,15	24,8
PLUR koncentráció függés	10,0	2,5	0		179 \pm 40	0,315 \pm 0,04	72,19	15,2
	10,0	2,5	0,05		178 \pm 21	0,304 \pm 0,09	98,34	19,7
	10,0	2,5	0,1		201 \pm 38	0,095 \pm 0,02	69,11	14,7
	10,0	2,5	0,5		206 \pm 36	0,089 \pm 0,06	57,94	12,6
	10,0	2,5	1,0		212 \pm 36	0,066 \pm 0,02	40,75	9,24

A csúcsmaximum kísérleti hibája 3 % alatti

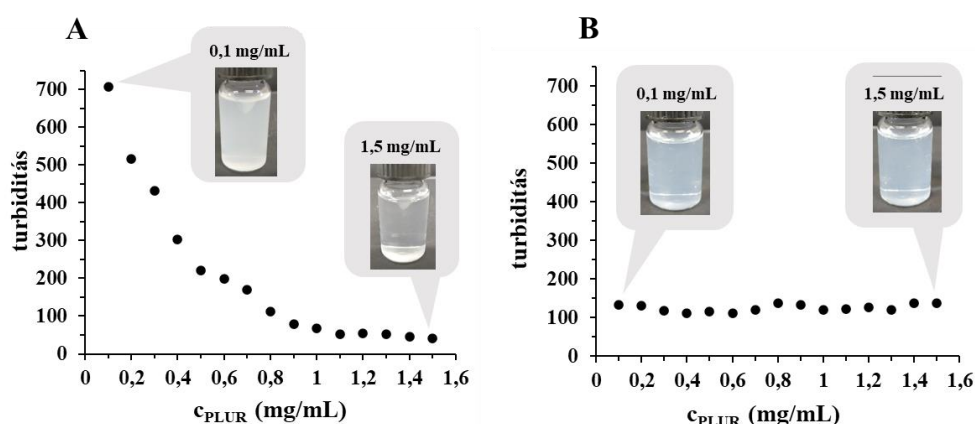
A **18. ábrán** bemutatott TEM képek alapján megállapítható, hogy kis mennyiségű (1,25 mg/mL) PLA jelenlétében főleg amorf szerkezetű részecskék és kristályos TP aggregátumok kialakulása valószínűsíthető. Mindezek mellett az alacsony polimer koncentráció miatt a hatóanyag kapszulázhatóságának meghatározása nem kivitelezhető. A mag-héj struktúra kialakulása csak nagyobb (10 mg/mL) polimer koncentrációknál tapasztalható. A TP koncentráció függésénél megfigyelt változások szerint, a TP

menyiségének növelésével, a vártak szerint, a részecskék hidrodinamikai átmérője fokozatosan nő. $c_{TP} = 5 \text{ mg/mL}$ elérésekor egy nagyobb méretnövekedés figyelhető meg. Ezeket a méretváltozásokat a TEM képek is megerősítik. A TP koncentráció változásakor a mag-héj szerkezet kialakulása már $c_{TP} = 2,5 \text{ mg/mL}$ esetén jól azonosítható 10 mg/mL PLA polimer koncentráció alkalmazása mellett. TP mennyiségének további emelésével a részecske magjában lévő hatóanyag jelentős része kristályos formát vesz fel. A minták hatóanyag tartalmát összehasonlítva kitűnik, hogy a kapszulázási hatékonyság ($EE(\%) = 91,28 \%$ - tól ($c_{TP} = 0,5 \text{ mg/mL}$) $EE(\%) = 66,15 \%$ -ig ($c_{TP} = 5 \text{ mg/mL}$)) a részecskék hatóanyag töltöttségének növekedésével párhuzamosan csökken ($DL(\%) = 4,36 \%$ -tól ($c_{TP} = 0,5 \text{ mg/mL}$) $DL(\%) = 24,85 \%$ -ig ($c_{TP} = 5 \text{ mg/mL}$)). Ennek legfőbb oka, hogy a kezdeti koncentráció növelésével a TP egyre kisebb része tud hasznosul a hordozóba vitelek, függetlenül attól, hogy a részecskében lévő mennyisége növekszik. A hatóanyag hordozóként alkalmazható rendszerek maximálisan elfogadható átmérőjére (kb. 200 nm [2]), a mag kristályosodására és a hatóanyag kapszulázhatóságára tekintettel, a PLUR stabilizátor optimális koncentrációjának meghatározásához a további vizsgálatok $c_{TP} = 2,5 \text{ mg/mL}$ és $c_{PLA} = 10 \text{ mg/mL}$ beállítása mellett történtek.



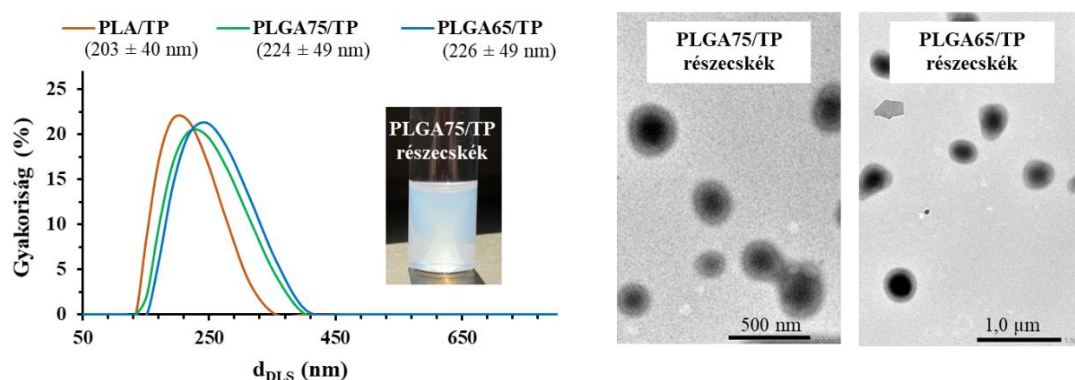
18. ábra: Nanoprecipitációval előállított TP-tartalmú PLA részecskékről készült reprezentatív TEM képek a különböző komponens koncentrációk mellett (*PLA függés:* $c_{TP} = 2,5 \text{ mg/mL}$, $c_{PLUR} = 0,1 \text{ mg/mL}$, *TP függés:* $c_{PLA} = 10 \text{ mg/mL}$, $c_{PLUR} = 0,1 \text{ mg/mL}$, *PLUR függés:* $c_{PLA} = 10 \text{ mg/mL}$, $c_{TP} = 2,5 \text{ mg/mL}$)

A TEM képek alapján megállapítható, hogy a stabilizátor alkalmazásának hiányában a TP kapszulázása nem valósul meg hatékonyan, így feltehetően a hatóanyag a PLA részecskék felületén kötődik meg. A mag-héj szerkezet kialakulásához legalább $c_{PLUR} = 0,1$ mg/mL szükséges. 1,0 mg/mL koncentrációjú PLUR alkalmazása esetén jelentős mennyiségű stabilizátor marad a részecskék felületén, melynek következtében olykor egy második héj kialakulása is megfigyelhető. A DLS méréseket elemezve, a stabilizátor koncentrációjának növelésével a polidiszperzitási index előrelátható csökkenése ($PI \approx 0,315$ ($c_{PLUR} = 0$ mg/mL) -tól $PI \approx 0,066$ ($c_{PLUR} = 1$ mg/mL) -ig)) és a részecskék hidrodinamikai átmérőjének megnövekedése (~ 179 nm -tól ($c_{PLUR} = 0$ mg/mL) ~ 212 nm -ig ($c_{PLUR} = 1$ mg/mL)) tapasztalható. Ez feltételezhetően a felületen egyre nagyobb mennyiségben megkötődő PLUR miatt következik be. Mindezek mellett megfigyelhető, hogy a már stabilizátort tartalmazó mintáknál a kapszulázási hatékonyság és a részecske hatóanyag töltöttsége szisztematikusan csökken ($EE(\%)$: $\sim 72\%$ -ról $\sim 41\%$ -ra; $DL(\%)$: $\sim 20\%$ -ról $\sim 9\%$ -ra). Ennek pontosabb megismeréséhez a rendszeren turbidimetriás méréseket végeztünk, ahol tanulmányoztuk a PLA és TP oldhatóságának változását a stabilizátor mennyiségének függvényében (**19. ábra**). A TP oldhatósága, a PLA polimerhez képest, PLUR jelenlétében jelentős mértékben megnövekszik, ezzel csökkentve a kapszulázható hatóanyag mennyiségét. A TEM felvételeket és a turbidimetriás adatokat összegezve az ideális mag-héj szerkezet előállítása 0,1 mg/mL PLUR jelenlététől elérhető, viszont $> 0,1$ mg/mL koncentrációnál a kapszulázási hatékonyság csökken, ami a hordozó rendszer felhasználhatósági potenciálját rontja. Ebből fakadóan a hatóanyag hordozóba vitele és a részecske tulajdonságai szerinti ideális koncentráció arányok $c_{PLUR} = 0,1$ mg/mL, $c_{TP} = 2,5$ mg/mL, $c_{PLA} = 10$ mg/mL.



19. ábra: (A) TP- és (B) PLA- tartalmú oldatok turbiditás értékei a PLUR koncentráció függvényében (vizes közeg, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $c_{TP} = 0,25$ mg/mL, $c_{PLA} = 0,25$ mg/mL)

A PLA alapú rendszerek esetén meghatározott optimális koncentrációk ismeretében tanulmányoztuk továbbá, hogy a kapszulázási hatékonyság növelhető-e a laktid: glikolid arányok változtatásával, illetve a PLGA alapú részecskék szerkezeti tulajdonságai megegyeznek-e a PLA alapú rendszerrel kapott tapasztalatokkal. A DLS mérések alapján a polimerekben lévő glikolid mennyiségének növekedésével a részecskeméret 203 nm-től 226 nm-ig folyamatosan nő (**20. ábra**). Megállapítható, hogy az optimális koncentrációk beállításával PLGA65 és PLGA75 alkalmazásával is megvalósítható a mag-héj szerkezet kialakulása (**20. ábra**). A rendszereken végzett ζ -potenciál mérések: *tisztítás előtt* $\zeta = -37,8 \pm 1,5$ mV (PLGA65), $\zeta = -29,3 \pm 1,2$ mV (PLGA75) és $\zeta = -25,3 \pm 1,9$ mV (PLA) és *tisztítás után* $\zeta = -73,5 \pm 1,0$ mV (PLGA65), $\zeta = -62,5 \pm 3,0$ mV (KP) és $\zeta = -79,2 \pm 2,5$ mV (PLA) értékeket mutattak, mely a részecskék nagymértékű stabilitását igazolják. A részecskék EE(%) és DL(%) értékeit összehasonlítva a PLA hordozóhoz képest a PLGA75 és PLGA65 vonatkozásában megfigyelhető értékek folyamatosan növekvő tendenciát mutatnak: EE(%)= 69,11 %, DL(%)= 14,73 (PLA); EE(%)= 75,72 %; DL(%)= 15,92 (PLGA75) és EE(%)= 87,69 %, (DL(%)= 17,98 (PLGA65)).



20. ábra: Nanoprecipitációval előállított TP- tartalmú PLA/PLGA részecskék méreteloszlási görbéi és a PLGA75/TP és PLGA65/TP mintákról készült TEM felvételek
($c_{\text{PLGA}} = 10$ mg/mL, $c_{\text{TP}} = 2,5$ mg/mL, $c_{\text{PLUR}} = 0,1$ mg/mL)

A szakirodalomban található TP-tartalmú részecskék hatóanyag töltöttségét, méretét és stabilitását figyelembe véve kijelenthető, hogy az általunk alkalmazott előállítási módszerrel a TP hatékonyabban kapszulázható a PLA/PLGA polimerekbe. Ennek összehasonlítás érdekében a TP-tartalmú és polimer (főként PLGA) alapú részecskék méretét, stabilitását és kapszulázási hatékonyságát bemutató publikációk megfelelő adatait a **6. táblázatban** összegeztük.

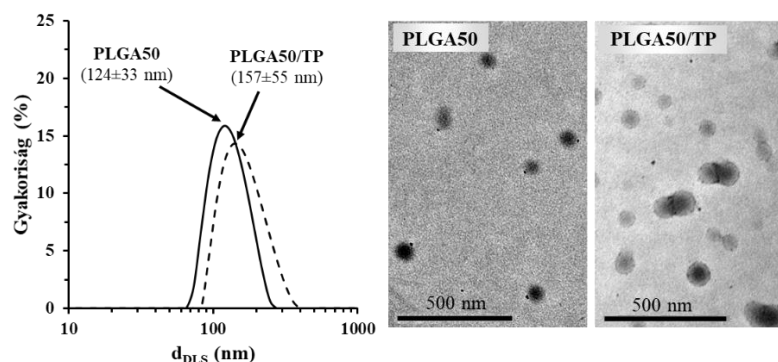
6. táblázat: A szakirodalomban jelenleg megtalálható, különböző módszerekkel előállított TP-tartalmú polimer alapú hordozó részecskék átlagos méretei, a ζ -potenciál, az EE(%) és DL(%) értékek a forrásközlemények megjelölésével

Polimer	Stabilizátor	d (nm)	ζ (mV)	EE(%)	DL(%)	Forrás
PLGA50	SDS PVA	50 – 70 ^a 200 – 290 ^b	-30 – -10 ^b	90 – 95 ^b	–	[116]
PLGA50/ Chit	PVA	100 – 110 ^c 110 – 140 ^d	-35 – 5 ^c 0 – 40 ^d	~95 ^c ~80 ^d	~ 2,5 ^c ~ 2,0 ^d	[121]
PLGA50/ Chit	–	80 – 400 ^c 300 – 3000 ^d	-80 – 0 ^c -80 – 60 ^d	~ 45 ^c 50 – 55 ^d	–	[122]
PLGA50/ Chit	PVA	~ 130 ^c ~175 ^d	~ -5 ^c ~ 10 ^d	–	~ 4,5 ^c ~ 4 ^d	[123]
PCL	PVA	240 – 1100	-7 – -20	25 – 95	2 – 3	[124]
PNIPAM- b-PCL-b- PNIPAM	–	40 – 300	3 – 10	40 – 50	8 – 10	[125]

a: SDS, b: PVA, c: PLGA50, d: PLGA50/Chit

5.2.2. TP-tartalmú PLGA50 részecskék előállítása áramlásos kémiai technikával

Legjobb tudásunk szerint PLGA alapú TP-tartalmú kolloid rendszerek folyamatos áramlási technikával történő előállítására az irodalomban nincs információ. Ezt szemelőt tartva, munkánk során megvizsgáltuk, hogy a korábban részletesen tanulmányozott nanoprecipitációs módszerrel előállított TP-tartalmú mag-héj szerkezetű részecskék folyamatos áramlásos rendszerben is kialakulnak-e, illetve a kezdeti paraméterek (relatív áramlási arány, áramlási sebesség, nyomás) szabályozásával milyen szerkezetbeli és méretbeli változások következnek be. Az alkalmazott mikromixer cellában való aggregáció elkerülése érdekében a kereskedelmi fogalomban kapható, a korábban általunk vizsgált PLGA75/65 kopolimerekhez képest hidrofílebb, PLGA50 kopolimerrel is elvégeztük a részecskék előállítását nanoprecipitációs módszerrel, hogy a mag-héj szerkezet kialakulásához meghatározzuk milyen polimer és TP koncentrációk szükségesek, az 5.2.1. alfejezetben már megállapított optimális koncentráció arányok mellett ($c_{\text{PLUR}} = 0,1$ mg/mL, $c_{\text{TP}} = 2,5$ mg/mL, $c_{\text{PLA/PLGA}} = 10$ mg/mL, $m_{\text{PLA/PLGA}/m_{\text{TP}}} = 4$). A DLS mérések és TEM felvételek szerint a koncentrációkat $c_{\text{PLGA50}} = 5$ mg/mL és $c_{\text{TP}} = 1,25$ mg/mL értékre csökkentve ($m_{\text{PLA/PLGA}/m_{\text{TP}}} = 4$, $c_{\text{PLUR}} = 0,1$ mg/mL) a korábbi eredmények reprodukálhatóak (21. ábra).



21. ábra: Nanoprecipitációval előállított TP-nélküli és TP-tartalmú PLGA50 részecskék méreteloszlása és TEM felvételei (*szerves fázis:* $c_{\text{PLGA50}} = 5 \text{ mg/mL}$ $c_{\text{TP}} = 1,25 \text{ mg/mL}$; *vizes fázis:* $c_{\text{PLUR}} = 0,1 \text{ mg/mL}$)

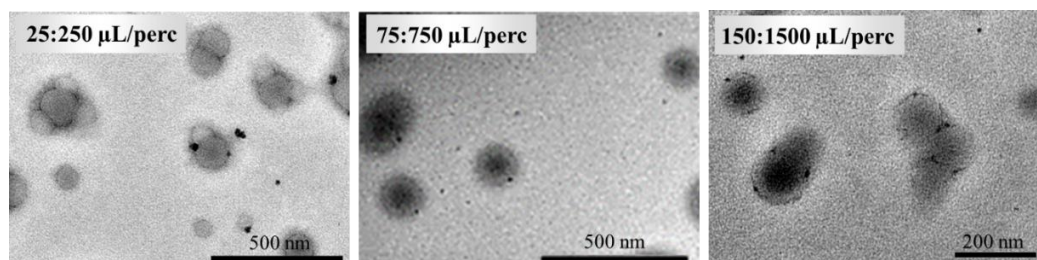
A PLGA50/TP nanorészecskék hidrodinamikai átmérőjére $d_{\text{DLS}} = 157 \pm 55 \text{ nm}$ értéket határoztunk meg, ami az általunk tapasztaltakkal és az szakirodalomban talált adatokkal jól korrelál (**6. táblázat**). A fent rögzített koncentrációkat alkalmazva a TP nélküli és TP-tartalmú PLGA50 nanorészecskéket μ -mixer cellával rendelkező Syrris Asia Flow rendszerben is előállítottuk. Az egyes mintáknál beállított paramétereket, a részecskék hidrodinamikai átmérőit és a polidiszperzitási index értékeit a **7. táblázatban** összesítettük.

7. táblázat: PLGA50 alapú TP-nélküli és TP-tartalmú folyamatos áramlásos technikával előállított részecskék DLS módszerrel meghatározott hidrodinamikai átmérője és polidiszperzitási index értékei különböző áramlási paraméterek függvényében

Acetonos Fázis	Vizes Fázis	$v_1:v_2$	p (bar)	TP-nélküli PLGA50 részecske		TP-tartalmú PLGA50 részecske	
				$d_{\text{DLS}} \pm \text{SD}^{\#}$ (nm)	PI \pm SD	$d_{\text{DLS}} \pm \text{SD}^{\#}$ (nm)	PI \pm SD
25	250	1:10	–	144 \pm 37	0,07 \pm 0,03	148 \pm 31	0,07 \pm 0,03
25	500	1:20	–	147 \pm 35	0,09 \pm 0,04	144 \pm 30	0,05 \pm 0,03
25	750	1:30	–	153 \pm 31	0,08 \pm 0,06	153 \pm 30	0,04 \pm 0,02
25	1000	1:40	–	177 \pm 51	0,13 \pm 0,03	153 \pm 38	0,04 \pm 0,03
25	1250	1:50	–	167 \pm 57	0,17 \pm 0,06	155 \pm 33	0,04 \pm 0,02
25	250	1:10	2	149 \pm 41	0,13 \pm 0,04	158 \pm 36	0,10 \pm 0,04
25	250	1:10	4	146 \pm 38	0,07 \pm 0,02	156 \pm 39	0,09 \pm 0,02
25	250	1:10	6	142 \pm 32	0,04 \pm 0,03	156 \pm 41	0,12 \pm 0,05
25	250	1:10	8	142 \pm 36	0,10 \pm 0,03	153 \pm 40	0,09 \pm 0,02
25	250	1:10	10	142 \pm 36	0,07 \pm 0,04	153 \pm 40	0,09 \pm 0,02
25	250	1:10	–	144 \pm 37	0,07 \pm 0,03	148 \pm 31	0,07 \pm 0,03
50	500	1:10	–	137 \pm 36	0,10 \pm 0,06	141 \pm 32	0,11 \pm 0,03
75	750	1:10	–	142 \pm 35	0,09 \pm 0,04	134 \pm 27	0,09 \pm 0,04
100	1000	1:10	–	132 \pm 33	0,10 \pm 0,03	167 \pm 48	0,15 \pm 0,02
150	1500	1:10	–	159 \pm 44	0,10 \pm 0,06	157 \pm 43	0,10 \pm 0,03

A csúcsmaximum kísérleti hibája 3 % alatti

Megállapítottuk, hogy a relatív áramlási arány ($v_1:v_2$) változtatása 1:10 -ről 1:50 értékre a hatóanyag nélküli nanorészecskékénél a méret növekedését eredményezi $d_{DLS} \approx 144$ nm-ről $d_{DLS} \approx 167$ nm-re, míg a polidiszperzitási index $PI \approx 0,07$ -ről $PI \approx 0,17$ -re nő, de a PLGA50/TP mintáknál csak kismértékű változás történik ($d_{DLS} = 144-155$ nm, $PI = 0,04-0,07$). A μ -mixer cellában beállítható nyomások növelésével sem a PLGA50 részecskékénél, sem a PLGA50/TP rendszer vonatkozásában nem látható változás. Ez jól mutatja, hogy a hatóanyag tartalmú nanorészecskékre a nyomás és a relatív áramlási arányok változtatása nincs jelentősebb hatással. Az áramlási sebesség változtatásánál a relatív áramlási arányát állandó 1:10 értéken tartottuk. A **7. táblázatból** jól látható, hogy egy jól meghatározott áramlási sebesség értékig jelentősebb változás nem figyelhető meg (PLGA50: $d_{DLS} = 132-144$ nm, PLGA50/TP: $d_{DLS} = 134-148$ nm). Egy kritikus értéket elérve a hidrodinamikai átmérő hirtelen növekedést mutat. Hatóanyag nélküli PLGA50 részecskékénél ez 150 $\mu\text{L/perc}$: 1500 $\mu\text{L/perc}$ ($d_{DLS} \approx 159$ nm), míg TP-tartalmú PLGA50 részecskékénél 100 $\mu\text{L/perc}$: 1000 $\mu\text{L/perc}$ ($d_{DLS} \approx 167$ nm) acetonos fázis : vizes fázis áramlási sebességeknél valósul meg. A részecskeméret szempontjából optimális áramlási sebességeket 75 $\mu\text{L/perc}$ (acetonos fázis) és 750 $\mu\text{L/perc}$ (vizes fázis) esetén állapítottuk meg (PLGA50: $d_{DLS} \approx 134$ nm). Ezt a rögzített TEM felvételek is megerősítik, ahol 75:750 $\mu\text{L/perc}$ esetén egy jól definiált mag-héj szerkezet kialakulását láthatjuk (**22. ábra**, $d_{TEM} = 132 \pm 22$ nm). Alacsonyabb sebességeknél a TP nem kerül a polimer hordozó magjába, míg túl magas értékeknél a részecskék már roncsolódnak, ami feltételezhetően a hidrodinamikai átmérőben történő növekedést is okozza (**7. táblázat**). A minták polidiszperzitását nézve a folyamatos áramlási rendszerben 75:750 $\mu\text{L/perc}$ alkalmazása mellett, a nanoprecipitációs módszerhez képest, lényegesen monodiszperzebb rendszert kapunk.



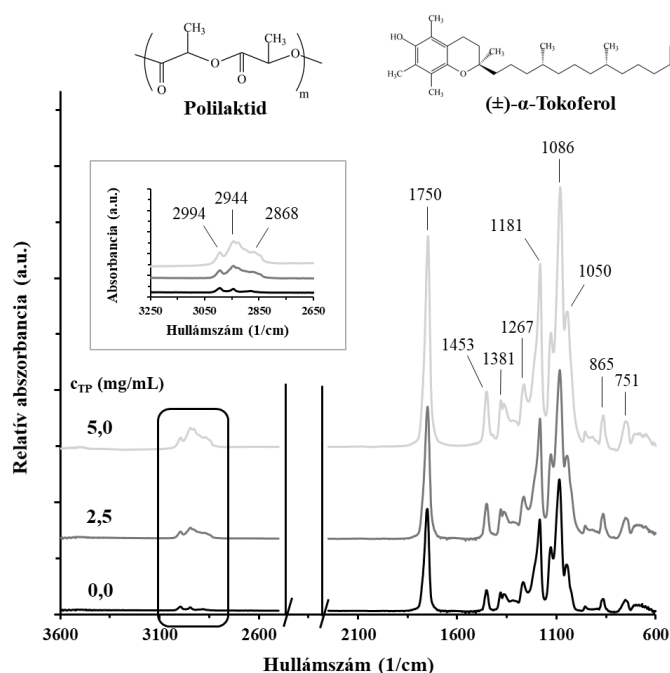
22. ábra: Különböző $v_1:v_2$ áramlási sebességeken elkészített TP-tartalmú PLGA50 részecskék reprezentatív TEM képei (szerves fázis: $c_{PLGA50} = 5$ mg/mL, $c_{TP} = 1,25$ mg/mL; vizes fázis: $c_{PLUR} = 0,1$ mg/mL).

A részecskék méretének és méreteloszlásának jellemzésén túl a DL(%) és az EE(%) értékeket is meghatároztuk mindkét módszernél. A nanoprecipitációnál $EE(\%) = 67,1$ %

(DL(%)= 14,4 %), míg az áramlásos technikánál (szerves: vizes fázis áramlási sebesség: 75:750 $\mu\text{L}/\text{perc}$) EE(%)= 71,5 % (DL(%)= 15,2 %) értéket kaptunk, így kijelenthető, hogy a két módszer hasonló kapszulázási hatékonysággal rendelkezik. A 5.2.1. alfejezetben már említett szakirodalomban található PLGA50/TP részecskékhez képest is egy monodiszperzebb és nagy kapszulázási hatékonysággal rendelkező rendszert állítottunk elő [116,121–123], amely előnyét a nagy mintamennyiség előállításának lehetősége még inkább növeli.

5.2.3. TP-tartalmú PLA/PLGA részecskék szerkezeti karakterizálása

A részecskéken belül kialakuló kölcsönhatások megismerése érdekében a tisztított és liofilizált mintákon FT-IR spektroszkópiás méréseket végeztünk. A PLA alapú részecskéknél a $-\text{CH}_2$ és $-\text{CH}_3$ csoportokhoz köthető aszimmetrikus és szimmetrikus rezgési sávok (2994 cm^{-1} , 2944 cm^{-1} és 2868 cm^{-1}) intenzitása TP jelenlétében nagyobb (23. ábra) [81,82,126].

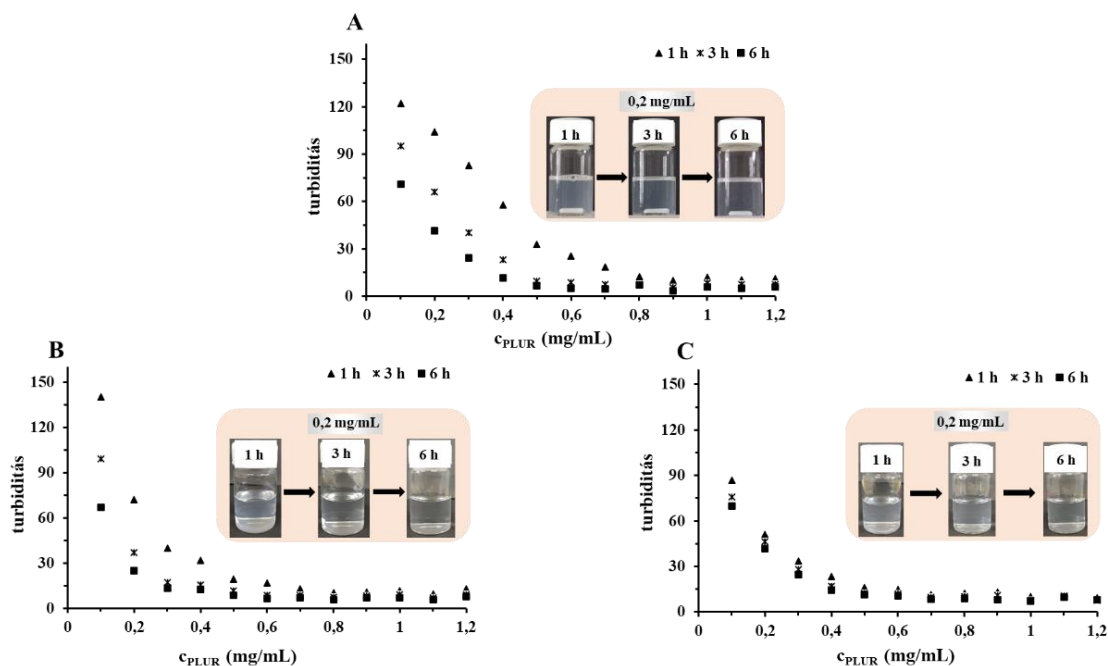


23. ábra: A PLA és TP-tartalmú PLA részecskék liofilizált pormintáinak FT-IR spektrumai (szerves fázis: $c_{\text{PLA}} = 10\text{ mg/mL}$, vizes fázis: $c_{\text{PLUR}} = 0,1\text{ mg/mL}$)

A karbonilcsoport 1750 cm^{-1} hullámszámnál azonosítható, függetlenül a vitamin koncentrációjától. Mivel a TP szerkezetén belül nincs $\text{C}=\text{O}$ csoport, ezért ez kifejezetten a polimerhez tartozó rezgési sáv. A $\nu > 1500\text{ cm}^{-1}$ tartományon a $-\text{CH}_2$ és $-\text{CH}_3$ deformációs és hajlító rezgései 1453 cm^{-1} , 1381 cm^{-1} és 1267 cm^{-1} -nél, míg a $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ nyújtó rezgési sávjai

1181 cm^{-1} és 1086 cm^{-1} -nél találhatóak. A TP -ban lévő Ar-O-C csoportnak köszönhetően a C-O-C szimmetrikus nyújtási rezgés sáv relatív abszorbancia értéke 1050 cm^{-1} -nél a koncentráció megnövekedésével nő. A különböző mennyiségű TP-tartalmazó PLA minták spektrumait összegezve a TP -ra érzékeny rezgési sávok főként 3050-2800 cm^{-1} és az ujjlenyomat tartományon belül 1150-1000 cm^{-1} találhatóak. Új sávok megjelenése nem figyelhető meg, mely alapján a polimer-hatóanyag között erősebb kölcsönhatás kialakulása nem valószínűsíthető. Az FT-IR spektrumokat PLGA50, PLGA65 és PLGA75 TP-tartalmú rendszerekre és tiszta polimerekre is hasonló következtetés vonható le, melyek közül reprezentatív módon a PLGA65 FT-IR spektrumait mutatjuk be a **M48. ábrán**. Feltételezhetjük tehát, hogy a mag-héj szerkezet kialakulása nem erős irreverzibilis kölcsönhatások kialakulásának köszönhető, ami meghatározó lehet a TP kioldódás folyamatára a hordozó mátrixból.

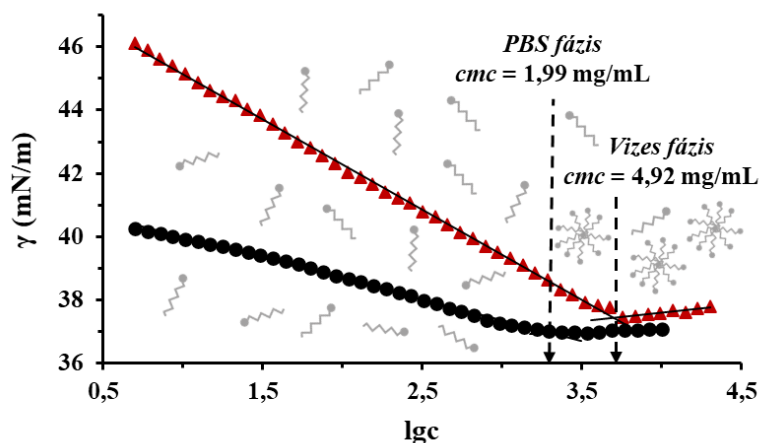
A TP és PLUR közötti kölcsönhatások megismerése érdekében turbidimetriás méréseket végeztünk nagy tisztaságú Milli-Q vizes közegben 25 °C-on (**24.A. ábra**), illetve PBS oldatban 25 °C (**24.B. ábra**) és 37 °C (**24.C. ábra**) hőmérsékleteken, mely eredmények nagyban hozzájárulnak a részecskék előállításához alkalmazott komponens koncentrációk optimalizálásához, és a hatóanyag felszabadulás értelmezéséhez is. A rendszer turbiditását 1 h, 3 h és 6 h után határoztuk meg.



24. ábra: TP turbiditás változása PLUR-tartalmú vizes (25 °C (A)) és PBS (pH= 7,4; 0,9 w/w% NaCl; 25 °C (B) és 37 °C (C)) oldatokban ($c_{\text{TP}}= 0,05 \text{ mg/mL}$)

A Milli-Q vizes közegben elvégzett kísérleteknél látható, hogy a turbiditás 0,9 mg/mL PLUR koncentráció értékig szisztematikusan csökken 1 h kevertetés után és a TP oldhatósága az idő függvényében nő, melyet alátámaszt a turbiditás értékek fokozatos csökkenése ugyanazon 25 °C -os mintasorozat esetén. 6 óra eltelte után a minimum érték 0,9 mg/mL-ről 0,5 mg/mL -re tolódik el, így kijelenthető, hogy hosszabb keverési idők mellett kisebb PLUR koncentráció alkalmazása is elegendő. A PBS közegben készített mintáknál 1 óra után egy meredekebb turbiditás esést tapasztaltunk, feltételezhetően a puffer oldatban lévő sók jelenlétével indukált PLUR *cmc* értékének eltolódása miatt. 6 óra után a vizes közeghez képest kisebb csökkenés látható. A hőmérséklet 37 °C -ra történő növelésével a kezdeti minimum turbiditás $c_{\text{PLUR}} = 0,7 \text{ mg/mL}$ -ről (25 °C) $c_{\text{PLUR}} = 0,6 \text{ mg/mL}$ -re csökken (37 °C). Ebben az esetben a TP oldhatósága 6 óra után sem változik a kezdeti értékekhez képest, így PLUR jelenlétében is kivitelezhető a TP *in vitro* kioldódásának tanulmányozása 37 °C hőmérsékleten.

A stabilizátorok *cmc* feletti koncentrációjánál a hatóanyagok nagyrésze a kialakuló individuális micellákba kapszulázódik [127], míg alacsonyabb koncentrációknál a stabilizátornak főként az oldhatóság növelésére gyakorolt hatása figyelhető meg. Annak érdekében, hogy a TP PLUR-tartalmú közegben történő oldhatóságáról részletesebb információt szerezzünk, meghatároztuk a PLUR *cmc* értékét Milli-Q vizes és PBS közegben felületi feszültség mérésekkel (25. ábra).



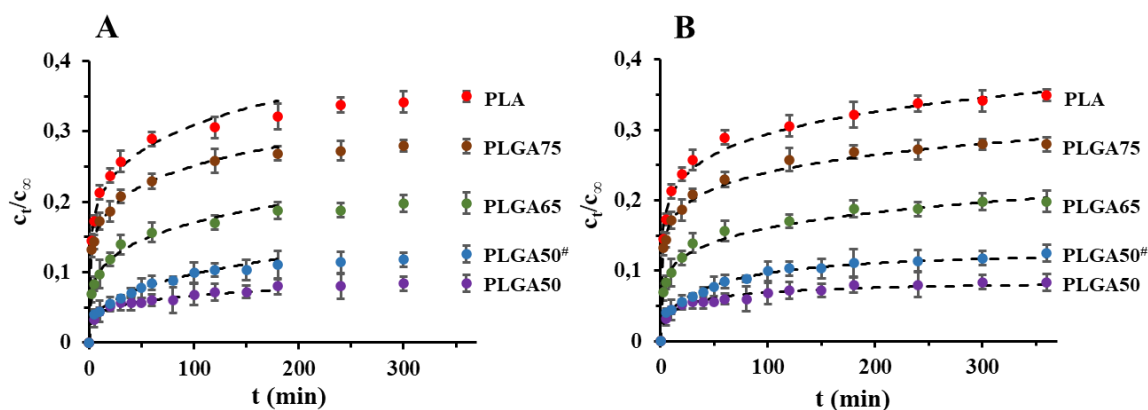
25. ábra: A PLUR *cmc* értékének meghatározása Milli-Q vizes (▲) és PBS (●) közegben ($t = 25 \text{ °C}$)

Az irodalomban található PLUR felületaktív anyaggal kapcsolatos *cmc* értékek nagyon széles skálán változnak (25 °C -on vizes közegben: 1-7 mg/mL) [86,128–130]. A *cmc*

reproduktív módon történő meghatározása után 25 °C hőmérsékleten Milli-Q vizes közegben $cmc = 4,92 \text{ mg/mL}$ kaptunk, ami PBS oldatban $cmc = 1,99 \text{ mg/mL}$ értékre csökken. Megállapíthatjuk tehát, hogy a turbidimetriás mérésekhez alkalmazott PLUR koncentráció tartomány (0-1 mg/mL) messze a cmc érték alatt található, ezáltal a PLUR jelenléte ténylegesen a TP oldhatóságát növeli.

5.2.4. TP *in vitro* kioldódási vizsgálata PLA/PLGA részecskékből

A TP-tartalmú PLA/PLGA rendszerek karakterizálását követően megkíséreltük a hatóanyag kioldódás folyamatát és annak mechanizmusát tanulmányozni. A szakirodalomban az *in vitro* kioldódási kísérleteket az általunk is alkalmazott hordozó rendszerekre főként több napos intervallumon végezték el, ezért a kezdeti szakaszon lejátszódó folyamatokról részletesebb információt nem szolgáltatottak. Mindezek túl a hatóanyag felszabadulás kinetikai sajátosságait sem tanulmányozták részletesen [116,121–123]. Ezek ismeretében, vizsgálataink során meghatároztuk a kioldódási folyamatokat mind a nanoprecipitációs, mind a folyamatos áramlásos kémiai technikával előállított PLA/PLGA alapú mintáknál (**26. ábra** és **M49. ábra**). Az egyes rendszerek kinetikai tulajdonságait nemlineáris regresszióval illesztett Korsmeyer-Peppas, Weibull és elsőrendű kinetikai modellekkel (**12.-14. egyenlet**) definiáltuk.



26. ábra: A különböző TP-tartalmú PLA/PLGA részecskékből a hatóanyag PBS közegben regisztrált kioldódási görbéi (● jelölt), illetve a mérési pontokra (A) Korsmeyer-Peppas és (B) Weibull kinetikai modellekkel történő illesztések (szaggatott vonallal jelölt) ($T = 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7,4$; 0,9 % NaCl; $c_{\text{PLUR}} = 1 \text{ mg/mL}$) (#: folyamatos áramlásos technikával előállított részecskék)

A felvett kioldódási görbéken jól látható, hogy a hordozó hidrofilitásának növekedésével a kioldódása folyamatosan lassul. 7 óra után a felszabadult TP mennyisége a következők

szerint változik: ~ 35,0 % (PLA), ~ 28,3 % (PLGA75), ~ 19,8 % (PLGA65), ~ 8,0 % (PLGA50, nanoprecipitáció), ~ 12,0 % (PLGA50, áramlásos technika). I. G. Zigoneanu és munkatársai korábban megállapították, hogy a TP-tartalmú PLGA50 alapú hordozó részecskék esetén a kisebb hatóanyag töltöttségű részecskék gyorsabb leadóképességgel bírnak [116]. Ez megfelel az általunk vizsgált rendszerre is, ahol a legnagyobb hatóanyag kioldódás a leghidrofóbabb és a viszonylag legkisebb hatóanyag-tartalmú PLA hordozónál tapasztalható (DL(%)= 14,7 % (PLA); DL(%)= 15,9 % (PLGA75); DL(%)= 18,0 (PLGA65); DL(%)= 14,4 % (nanoprecipitáció, PLGA50; DL(%)= 15,2 % (áramlásos technika, PLGA50)). Fontos kiemelni, hogy a PLGA50 esetében kis kapszulázási hatékonyságához képest kisebb kioldódás társul. Ezt a hidrofilitási tulajdonság változásával magyarázhatjuk. A hidrofóbabb karakterű részecskéknél nagyobb mennyiségű TP tud megkötődni a felület közelében, ahonnan a hatóanyag kioldódása lényegesen gyorsabban végbemegy. Ennek köszönhető, hogy a görbék kezdeti 0-20 perces tartományán hirtelen lejátszódó TP felszabadulás a polimerben lévő glikolid arányának csökkenésével egyre növekszik. Ez egyértelműen alátámasztja, miszerint a rövidtávú kioldódási folyamatokat a részecskék hatóanyagtartalmán kívül az alkalmazott polimerek hidrofilitása is jelentősen befolyásolja.

A kioldódási görbékre illesztett kinetikai modellek determinációs együtthatói szerint a legjobb illeszkedést a Korsmeyer-Peppas (**26.A. ábra**), míg a második legjobb illeszkedést a Weibull (**26.B. ábra**) egyenlet adja (**8. táblázat**).

8. táblázat: A TP -tartalmú PLA/PLGA alapú hordozó rendszerek kioldódási görbéire illesztett kinetikai modellek (**12-14. egyenlet**) megfelelő paraméterei

Modell	Elsőrendű		Korsmeyer-Peppas			Weibull		
	k (min ⁻¹)	R ²	k _m (min ⁻ⁿ)	n	R ²	a	b	R ²
PLA	0,0094	0,9792	0,1339	0,182	0,9898	6,52	0,178	0,9896
PLGA75	0,0113	0,9532	0,1120	0,175	0,9982	7,85	0,166	0,9819
PLGA65	0,0130	0,9514	0,0592	0,223	0,9904	15,45	0,220	0,9898
PLGA50	0,0115	0,9189	0,3200	0,197	0,9793	4,16	0,430	0,9728
PLGA50 [#]	0,0088	0,9497	0,1680	0,333	0,9934	8,37	0,545	0,9882

[#]: folyamatos áramlásos technikával előállított részecskék

A Korsmeyer-Peppas modellből szerezhető kinetikai paraméterek (k_m, n) jelentős információ tartalommal rendelkeznek. A hatóanyag kioldódását jellemző diffúziós-oldódási

index $n = 0,175-0,333$ közötti értékeket vesz fel, amely kvázi Fick - diffúzió kontrollált hatóanyag leadásra utal. Ekkor a polimer hordozóban végbemenő eróziós folyamatok a TP felszabadulására jelentős hatással nem bírnak. A hatóanyag felszabadulását nézve a hordozó hidrofilitásának növelése a hatóanyag visszatartását fokozza, azonban a kioldódás diffúzió kontrollált jellegére nem lesz hatással. A diffúziós-oldódási index minden esetben $n = 0,42$ -nél kisebb. Ez a rendszer polidiszperzitása miatt lehetséges [131]. A mért és a számított eredmények egyértelműen igazolják, hogy a hatóanyag felszabadulás főleg a PLA/PLGA részecskék felülete közeléből történt. Ennek köszönhetően meghatározható a mag-ban lévő TP mennyiségének értéke 7 óra letelte után: $DL(\%) = 9,6 \%$ (PLA); $DL(\%) = 11,4 \%$ (PLGA75); $DL(\%) = 14,4 \%$ (PLGA65); $DL(\%) = 13,2 \%$ (PLGA50, nanoprecipitáció); $DL(\%) = 13,4 \%$ (PLGA50, áramlásos technika). Az értékek jól mutatják, hogy a hidrofilitás növelésével a magban lévő hatóanyag mennyisége fokozatosan növelhető.

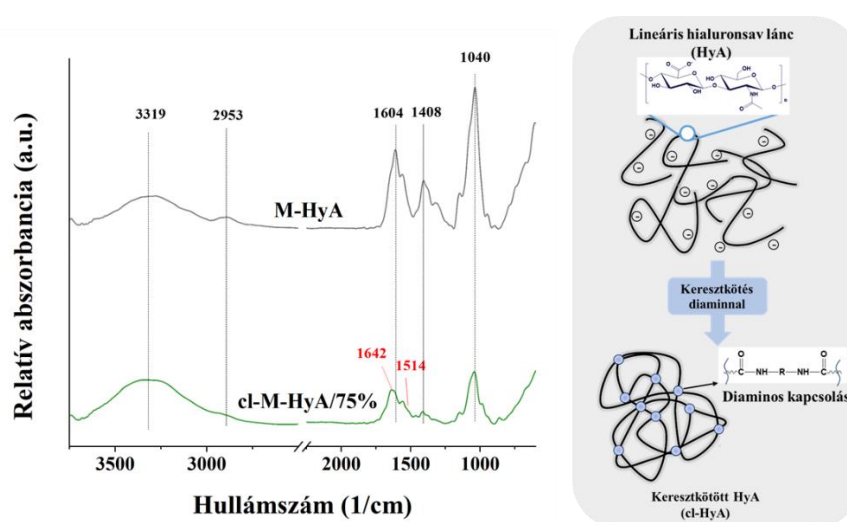
5.3. Keresztkötött és CTAB –dal részlegesen hidrofóbizált HyA nanorészecskék előállítása, szerkezetvizsgálata és felhasználásuk KP kapszulázására

A korábbi fejezetekben tárgyalt PLA/PLGA polimerekkel kapcsolatos vizsgálatoknál a polimerek és hatóanyagok hidrofilitásának, illetve az előállítási protokollokhoz alkalmazott kiindulási paraméterek változásának hatásával szabályozható tulajdonságokat (pl. méret, morfológia, kapszulázási hatékonyság) tanulmányoztuk. Ezen vizsgálatokat folytatva a kutatási munkánkat a hidrophil tulajdonságú hialuronsav poliszacharidra is kiterjesztettük. A doktori munkám második felében a HyA különböző technikákkal megvalósítható hidrofóbizálását végeztük el, annak érdekében, hogy hordozóként is alkalmazható nanorészecskéket állíthassunk elő.

5.3.1. Keresztkötött HyA nanorészecskék előállítása és karakterizálása

A 2.2.2. *alfejezetben* korábban részletezettek alapján a HyA térhálósításával (keresztkötések kialakítása révén) hatóanyag hordozó rendszerek állíthatóak elő [106], amelyhez gyakran alkalmaznak különböző diaminoakat (karbodiimides technika) [60,104,105]. Ezt alapul véve, reprodukív módon szintetizáltunk diaminos kapcsolással különböző mértékben keresztkötött HyA makromolekulákat (cl-M-HyA) (**27. ábra**). Munkánk során, a korábbi publikációkban ismertetett rendszerekkel szemben [60,104,105] egy viszonylag kisebb molekulatömegű HyA -t használtunk fel (M-HyA: $M_w = 200-500$ kDa, Richter Gedeon Nyrt.) a kisebb részecskeméret elérése érdekében. A keresztkötést 50, 75 és 100 % mértékű térhálósítás beállítása mellett kiviteleztek. A tisztított rendszerek esetén a

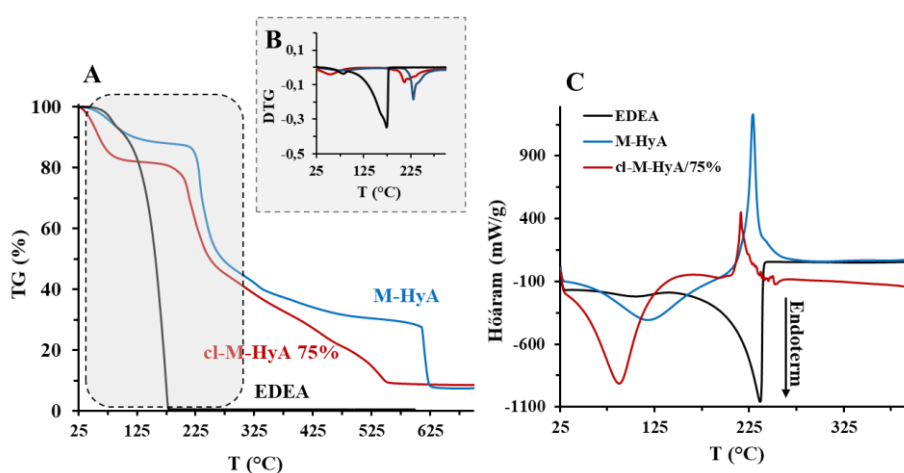
kötések igazolása érdekében FT-IR spektroszkópiás méréseket végeztünk (**27. ábra**). A tiszta M-HyA esetén az -OH és -NH csoportok rezgési sávjai 3319 cm^{-1} és 2953 cm^{-1} hullámszámnál találhatóak. Alacsonyabb hullámszám értékeknél a karboxilátcsoport szimmetrikus C-O nyújtó rezgése 1408 cm^{-1} -nél jelenik meg [132]. A cl-M-HyA /75% spektrumán megfigyelhető, hogy a M-HyA 1604 cm^{-1} -nél látható karboxilátcsoportoz tartozó aszimmetrikus C-O nyújtórezgési sávja jelentősen eltolódik 1642 cm^{-1} hullámszámra az -amid I csúcs felé, ami a keresztkötés kialakulásának sikerességét mutatja [133–136]. Mindezek mellett a keresztkötött M-HyA esetén 1514 cm^{-1} -nél az -amid II sávhoz tartozó kisebb rezgési elnyelés is megjelenik.



27. ábra: A liofilizált és 75% -ban keresztkötött M-HyA (cl-M-HyA/75%) és a kiindulási M-HyA FT-IR spektrumainak részlete (bal oldal) illetve a szintézis sematikus ábrája (jobb oldal)

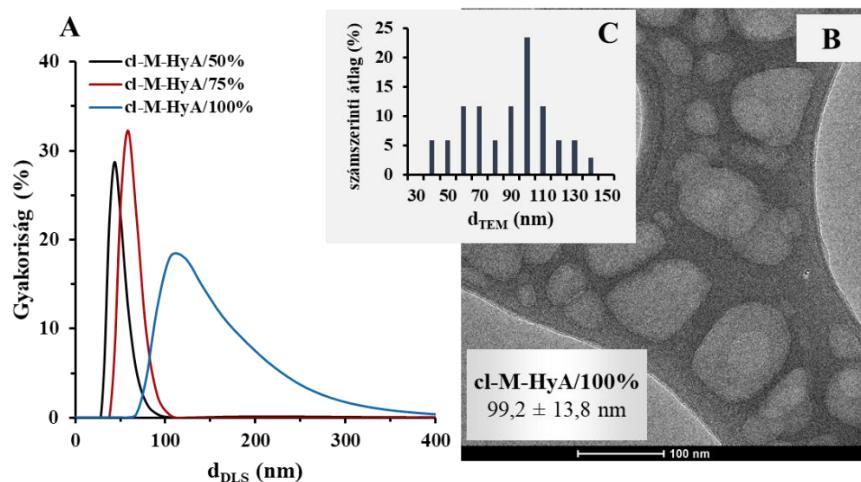
A mintákat ezt követően termoanalitikai mérésekkel is karakterizáltuk (**28. ábra**). Referenciaként az EDEA és a tiszta M-HyA termikus sajátságait is megvizsgáltuk. A M-HyA hidrofíli tulajdonságának köszönhetően a kiindulási és a keresztkötött cl-HyA is nagy mennyiségű vizet tartalmaz, mely a M-HyA esetén ez a bemért tömeg 13 % -át, míg cl-M-HyA/75% esetén a 19% -át teszi ki. A fizikailag megkötött víz eltávolítása után a poliszacharid degradációja és az EDEA forrása játszódik le. A TG és derivatív termogravimetriás (DTG) görbék segítségével a következő forráspontot (EDEA) és degradációs hőmérsékleteket (M-HyA, cl-M-HyA/75%) határoztuk meg: $T_f = 109\text{ }^\circ\text{C}$ (EDEA), $T_d = 205\text{ }^\circ\text{C}$ (M-HyA), $T_d = 167\text{ }^\circ\text{C}$ (cl-M-HyA/75%). A kezdeti M-HyA makromolekulához képest a cl-M-HyA/75% mintánál látható hőmérséklet csökkenését a poliszacharidban kialakuló keresztkötések okozhatják. A keresztkötő EDEA ágens

forráspontjánál és a M-HyA ~ 603 °C -nél megfigyelhető tömegváltozások a cl-M-HyA/75% TG görbéjén nem jelennek meg, így kijelenthető, hogy a tisztítás és liofilizálás után a minták szennyeződést nem tartalmaznak. A DSC vizsgálatok alapján a M-HyA bomlásának exoterm csúcs maximuma 222 °C -on, illetve az EDEA endoterm forráspontjához/bomlásához tartozó endoterm csúcs minimuma 236 °C hőmérsékleten jelenik meg. Az EDEA esetén a TG -hez viszonyított nagymértékű hőmérséklet eltolódás a zárt cellában történő mérés miatt következhet be. A cl-M-HyA/75% degradációs hőmérséklete ($T_{d,max} = 216$ °C) exoterm sajátossággal bír, amit feltételezhetően a mintában megtalálható keresztkötésben lévő M-HyA indukál.



28. ábra: A 75% -ban keresztkötött M-HyA (cl-M-HyA/75% (piros)), a keresztkötő EDEA komponens (fekete) és a M-HyA (kék) (A) TG, (B) DTG és (C) DSC görbái

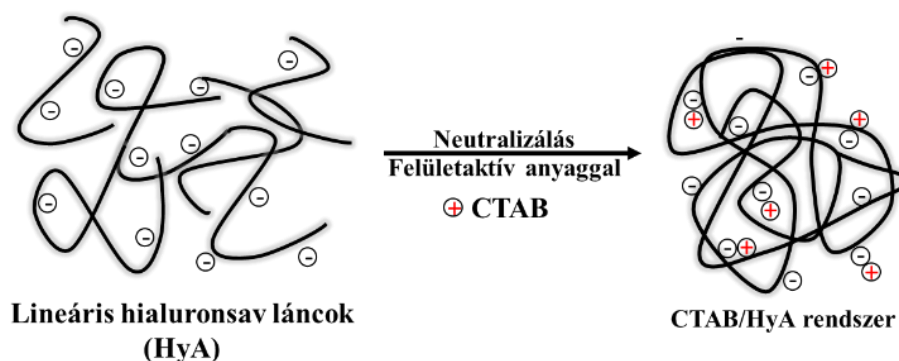
A keresztkötött M-HyA származékok karakterizálása után meghatároztuk a szintézis során keletkezett részecskék hidrodinamikai átmérőjét. A **29.A. ábrán** bemutatott méreteloszlási görbéken jól látható, hogy a keresztkötés mértékének növekedésével a részecskeméret és a polidiszperzitás szisztematikusan nő $d_{DLS} \approx 45$ nm -ről (cl-M-HyA/50%) $d_{DLS} \approx 110$ nm -ig (cl-M-HyA/100%). A mintákról TEM felvételeket is készítettünk, amelyek közül egy a cl-M-HyA/100% -nál rögzített képet a **29.B. ábrán** mutatunk be, ahol kapott részecskeméret változások a DLS mérésekkel összhangban vannak (**29.C. ábra**). A ζ -potenciál értékek vonatkozásában a magasabb keresztkötési arányoknál a részecskék egyre negatívabb értéket vesznek fel (cl-M-HyA/50%: $\zeta = -13,8 \pm 0,1$ mV, cl-M-HyA/75%: $\zeta = -20,0 \pm 2,1$ mV, cl-M-HyA/100%: $\zeta = -23,6 \pm 0,6$ mV).



29. ábra: (A) A különböző mértékben keresztkötött M-HyA nanorészecskék méreteloszlása, illetve (B) cl-M-HyA/100% részecskékről készült TEM felvétel és (C) a meghatározott számszerinti méreteloszlás

5.3.2. CTAB -dal neutralizált HyA nanorészecskék előállítása és karakterizálása

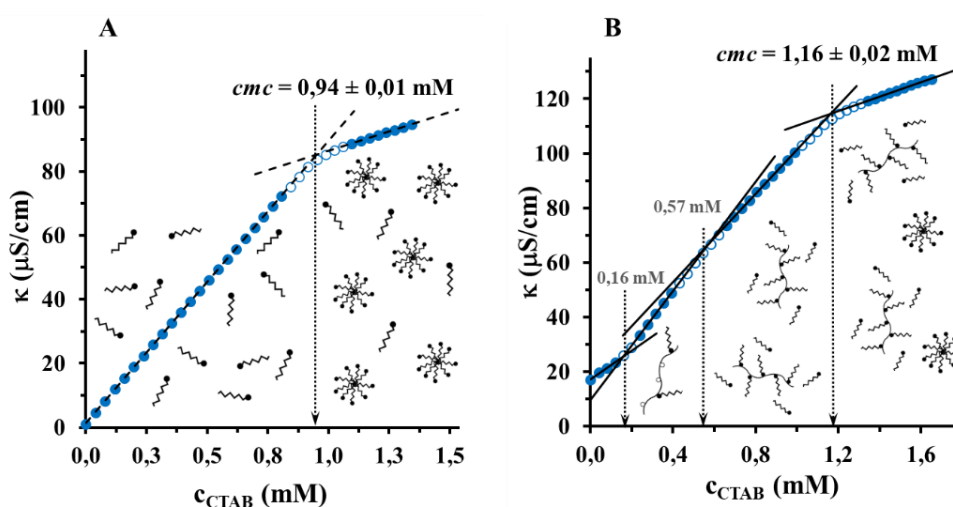
Jól ismert, hogy a kationos felületaktív anyagok és az anionos M-HyA között kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatások révén jól definiált komplex rendszerek állíthatók elő [59,106]. Annak érdekében, hogy a térhálósított polimerhez hasonló kolloidális komplexeket, mint gyógyszerhordozó rendszereket állíthassunk elő, az általunk felhasznált M-HyA poliszacharidot ($M_w = 200\text{--}500$ kDa) részlegesen és teljesen neutralizáltuk pozitív töltésű CTAB felületaktív anyag segítségével (**30. ábra**).



30. ábra: A HyA CTAB-dal történő neutralizálásának sematikus ábrája

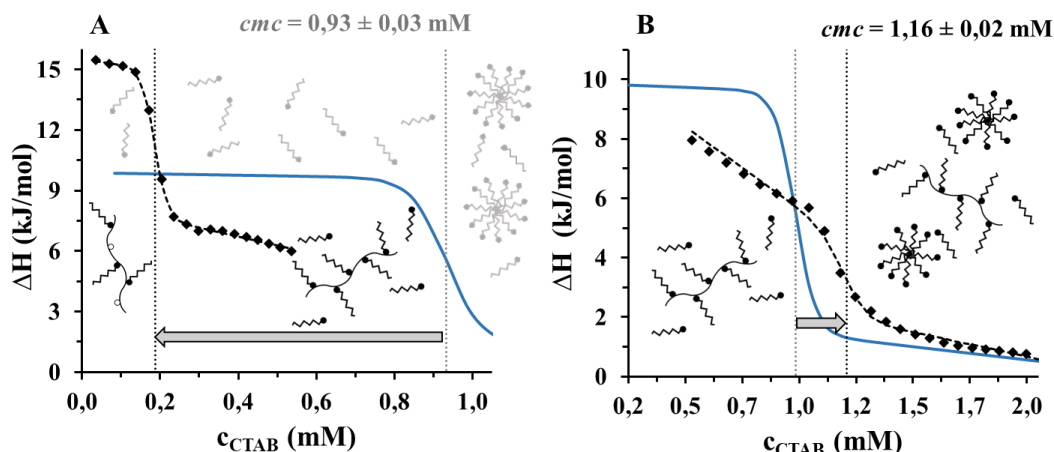
A M-HyA/CTAB komplex rendszerek kialakítása előtt fontos a poliszacharid-felületaktív anyag közötti elektrosztatikus kölcsönhatások kvantitatív megismerése. A M-HyA neutralizációs tulajdonságait első lépésben konduktometriás és ITC módszerekkel tanulmányoztuk. Előmérésként meghatároztuk a CTAB cmc értékét M-HyA jelenléte nélkül,

ahol mind a konduktometriával, mind a ITC -vel hasonló értéket kaptunk (*konduktometria*: $\text{cmc}_{\text{CTAB}} = 0,94 \pm 0,01 \text{ mM}$; *ITC*: $\text{cmc}_{\text{CTAB}} = 0,93 \pm 0,03 \text{ mM}$) (**31.A. és 32.A. ábra**). Ezek a szakirodalomban fellelhető adatokkal nagyon jó egyezést mutatnak [137,138]. A méréseket megismételve 0,1 mg/mL koncentrációjú M-HyA oldatban az adott *cmc* értékek $1,16 \pm 0,02 \text{ mM}$ -re tolódnak el (**31.B. és 32.B. ábra**). Az eredményekből megállapítható, hogy a rendszerben lejátszódó folyamatok első lépéseként a negatív töltésű M-HyA poliszacharidot a pozitív töltésű CTAB kb. 1,00:1,00 $n_{\text{CTAB}} : n_{\text{HyA,monomer}}$ mólarány (0,95:1,00 tömegarány) mellett neutralizálja, melynek befejeződése után a stabilizátor micellaképződése kezdődik el.



31. ábra: (A) M-HyA nélküli és (B) M-HyA tartalmú rendszerekben a CTAB *cmc* értékének meghatározása konduktometriás módszerrel ($c_{\text{HyA, kezdeti}} = 0,1 \text{ mg/mL}$)

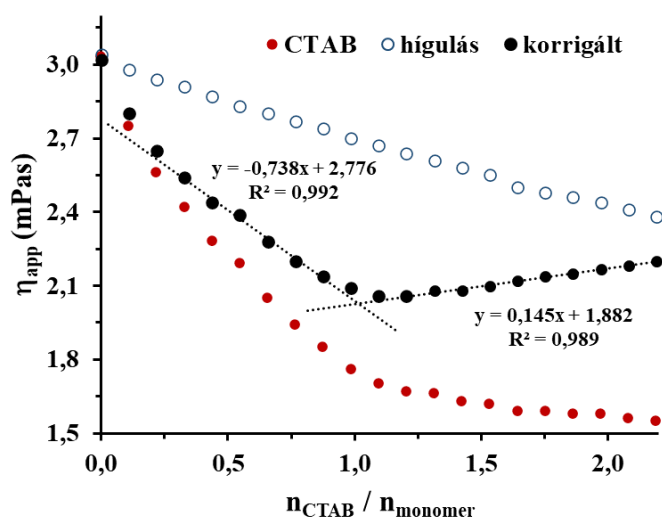
J. Krouská és M. Pekař 10 kDa -tól 1750 kDa molekulatömeggel rendelkező HyA és CTAB/TTAB között kialakuló kölcsönhatásokat már vizsgálták nagyfelbontású ultrahangos spektroszkópiával [139]. A rendszerükön végzett mérések alapján a kritikus aggregációs koncentráció (*cac*) 1:1 körüli töltési arányok beállta esetében figyelhető meg. Ezt egy későbbi publikációjukkal még inkább megerősítették [140]. Azonban fontos megjegyezni, hogy az eredményeiket *cmc* feletti koncentrációknál kapták, ahol a micellák képződése jelentősen befolyásolhatja az adatokat. Ennek ismeretében a *cac*, és ezzel a lineáris HyA ekvivalens töltésének pontos meghatározásához a ITC mérést kisebb koncentrációjú felületaktív anyag esetében is elvégeztük ($c_{\text{HyA}} = 0,1 \text{ mg/mL}$, $c_{\text{CTAB}} = 5 \text{ mM}$). A **32.A. ábrán** látható, hogy a CTAB *cmc* értéke mellett a töltéskompenzáció mértékére meghatározott arányok is jó egyezést mutatnak a konduktometriás adatokkal.



32. ábra: Az ITC mérésekből nyert kalorimetriás entalpia görbék (A) 5 mM és (B) 12 mM koncentrációjú CTAB titráló oldatok mellett ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $c_{\text{HyA,kezdeti}} = 0,1\text{ mg/mL}$) (a HyA nélküli mérést a kék vonal jelzi)

A HyA áttöltését jelző inflexióspont $0,2 \pm 0,01\text{ mM}$ koncentrációnál (a konduktometriás mérések esetén $\sim 0,16\text{ mM}$ megjelenő változásnál (31.B. ábra)) jelenik meg, ami molarányok szerint átlagosan 1,2:1,0 értéket jelent. Vizsgálatainkkal megerősítettük, hogy a M-HyA felületaktív anyaggal történő töltéskompenzálás aránya a CTAB koncentrációjával szabályozható.

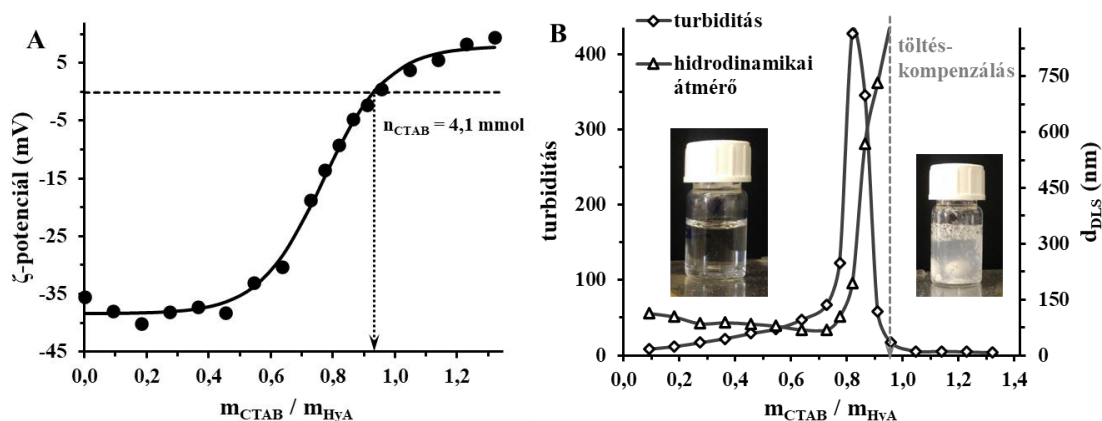
Az ITC és konduktometriás mérések mellett a M-HyA látszólagos viszkozitását is meghatároztuk állandó nyírósebességen elvégzett reológiai mérésekkel, melyek eredményét a 33. ábra foglalja össze.



33. ábra: M-HyA látszólagos viszkozitási görbéje állandó nyírási sebesség mellett ($c_{\text{HyA, kezdeti}} = 0,1\text{ mg/mL}$, $c_{\text{CTAB, titráló oldat}} = 25\text{ mM}$)

A módszer előnye, hogy a viszkozitáson kívül a vizsgált minta szerkezeti változásait is azonosíthatjuk. A CTAB/M-HyA(monomer) molarány folyamatos növekedésével a látszólagos viszkozitás értéke fokozatosan csökken. Annak érdekében, hogy a CTAB okozta szerkezeti hatásokat igazoljuk szükséges a rendszer hígulásával korrekciót végezni, ahogyan azt a **33. ábra** is mutatja. Az így meghatározott látszólagos viszkozitás értékek szerint, a rendszerben történő szerkezeti változások (feltételezhetően az aggregációs folyamatok) okán, a CTAB mennyiségének növelése mellett megfigyelhető kezdeti csökkenést egy törés szakítja meg, amelyet folytatólagosan már egy lineárisan növekvő szakasz követ. A szakaszokra illesztett egyenesek metszéspontjából meghatározható a M-HyA poliszacharidhoz rendelhető áttöltési pont. A számolások alapján a M-HyA neutralizálás közelítő értékére $n_{\text{CTAB}}/n_{\text{HyA,monomer}} = 1,012$ kaptunk, ami a korábbi eredményeinkkel (konduktometria, ITC) jó összhangban van.

A M-HyA/CTAB közötti kölcsönhatások karakterizálását követően a komplex rendszer ζ -potenciálját és hidrodinamikai átmérőjét a $m_{\text{CTAB}} : m_{\text{HyA,monomer}}$ tömegarány⁴ függvényében tanulmányoztuk (**34. ábra**), mely során megállapítottuk, hogy a részecskék méretében és stabilitásában történő változások a kalorimetriás és a vezetőképesség mérések eredményeivel jól összevethetőek. A teljes áttöltési pont eléréséig (0,95:1,0 tömegarány) a M-HyA alapú részecskék ζ -potenciálja negatív értéket vesz fel.



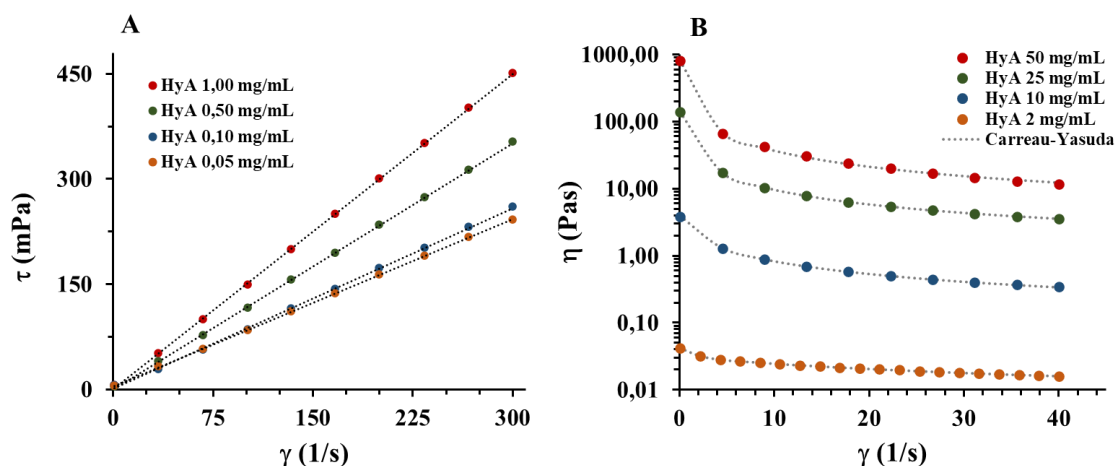
34. ábra: M-HyA/CTAB rendszer (A) ζ -potenciál, (B) turbiditás és hidrodinamikai átmérő értékei a $m_{\text{CTAB}} : m_{\text{M-HyA,monomer}}$ tömegarányok függvényében. A töltéskompenzálás előtt ($m_{\text{CTAB}}/m_{\text{HyA,monomer}} = 0,2$) és után ($m_{\text{CTAB}}/m_{\text{HyA,monomer}} = 0,95$) készített minták reprezentatív fotói (B) ($c_{\text{HyA}} = 0,2$ mg/mL, $c_{\text{CTAB}} = 0,0-0,26$ mg/mL, PBS közeg)

⁴ A korábban alkalmazott $n_{\text{CTAB}}/n_{\text{HyA(monomer)}}$ molarányokat azért váltottuk át $m_{\text{CTAB}}/m_{\text{HyA}}$ tömegarányokra, mert a CTAB és a HyA egy monomer egységének móltömege közel megegyezik.

Efölött a rendszer stabilitása jelentősen lecsökken, amit a turbidimetriás mérések is megerősítenek. A **34.B. ábrán** látható, hogy a $\sim 0,80$ tömegarányig átlagosan 50-130 nm közötti hidrodinamikai átmérő érhető el. Megállapítható továbbá, hogy $\sim 0,80$ tömegarány felett a rendszerben lejátszódó M-HyA neutralizálásának köszönhetően a hidrodinamikai átmérő 50 nm -ről 750 nm -re nő. A turbiditást nézve a 0,80-0,95 tömegarányok közt jelentős növekedés figyelhető meg, amit a nagyfokú aggregáció miatt kialakuló fázisszeparáció (oldószer fázis/szilárd M-HyA/CTAB aggregátumok) hirtelen lecsökkent. Ebből látható, hogy feleslegben lévő CTAB jelenlétében keletkező részecskék gyógyszerhordozóként való felhasználhatóságát nézve nem optimálisak, így a M-HyA ezen a tartományon nem alkalmazható hordozóként. Eredményeinket összevetve az irodalmi adatokkal megállapítható, hogy átlagosan kisebb mérettel rendelkező részecskéket tudtunk előállítani. T. Krutišová és munkatársai korábban már vizsgálták a CTAB -ból, illetve $M_w = 117$ és 1670 kDa molekulatömeggel rendelkező HyA -ból felépülő nanorészecskéket, viszont csak 100 nm feletti részecskeméreteket kaptak [141]. T. Pilgrova és M. Pekař munkája során a CTAB/Septonex és HyA ($M_w = 13$ kDa, 117 kDa és 1635 kDa) összetételű rendszereket turbidimetriás és DLS módszerekkel tanulmányoztak, ahol azonban a CTAB -dal összevethető szerkezetű Septonex (karbetopendecínium bromid) stabilizátorral és HyA -val ($M_w = 13$ kDa, 117 kDa) az általunk meghatározottakhoz képest jóval nagyobb, 200 - 500 nm -es részecskéket tudtak előállítani [142].

5.3.3. HyA alapú rendszerek reológiai tulajdonságai

Az Irodalmi áttekintésben (2.3.2. *alfejezet*) korábban már részleteztük, hogy a HyA alapú rendszerek folyási tulajdonságainak, ezáltal a külső erők hatásra bekövetkező szerkezeti változásainak megismerése érdekében a reológiai mérések kiemelkedő szereppel bírnak. Azonban fontos megjegyezni, hogy a hordozó rendszereknél releváns nagyon kis koncentrációjú HyA oldataival kapcsolatban kevés információ található. Ezt figyelembe véve, meghatároztuk a M-HyA viszkozitási tulajdonságait szélesebb koncentráció intervallumon (0,05-50 mg/mL) (**35. ábra**). A koncentráció függvényében detektált viszkozitási görbéket Bingham- (**5. egyenlet**) és Carreau-Yasuda (**6. egyenlet**) modellel illesztettük, melyek eredményeit a **9. táblázatban** összesítettük. A rögzített görbéken jól látható, hogy alacsonyabb M-HyA koncentrációjú oldatok Newtoni viselkedést mutatnak, ami a koncentráció növelésével pszeudopasztkusra, majd viszkoelasztkusra vált át. Nagyon híg polimer (molekuláris) oldatoknál a viszkozitás változása kiemelten a poliszacharid áramlási rendszerbeli viselkedésével (pl. deformációs, orientációs) köthető össze.



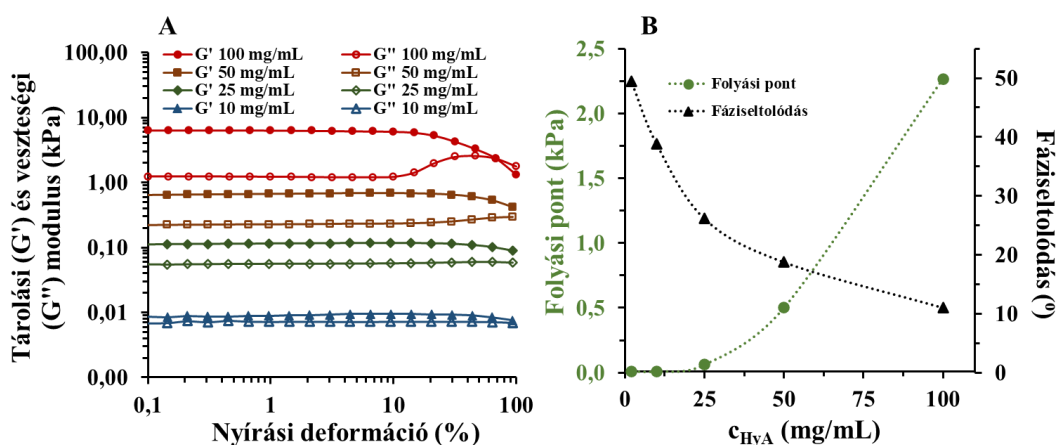
35. ábra: (A) Alacsony koncentrációjú (0,05-1,0 mg/mL) M-HyA oldatok nyírófeszültségének és (B) a nagyobb koncentrációjú (2-50 mg/mL) oldatok/gélek viszkozitásának változása a nyírósebesség függvényében

9. táblázat: A különböző koncentrációjú M-HyA/CTAB oldatok viszkozitás és nyírófeszültség görbéire illesztett Bingham és Carreau-Yasuda modellekből meghatározott plasztikus viszkozitás (η_{pl}), Bingham-féle folyáshatár (τ_B), nulla- nyírási viszkozitás (η_0) és végtelen-nyírási viszkozitás (η_∞) értékek

c_{HyA} (mg/mL)	$\eta_{pl} \pm SD$ (mPa s)	$\tau_B \pm SD$ (Pa)	$\eta_0 \pm SD$ (Pa s)	$\eta_\infty \pm SD$ (Pa s)
0,05	$0,792 \pm 0,006$	—	—	—
0,10	$0,872 \pm 0,000$	—	—	—
0,50	$1,180 \pm 0,007$	—	—	—
1,00	$1,508 \pm 0,007$	—	—	—
2,00	$10,76 \pm 0,211$	$0,217 \pm 0,007$	$0,046 \pm 0,003$	$0,000 \pm 0,000$
10,00	$128,3 \pm 8,391$	$8,493 \pm 0,283$	$4,368 \pm 0,010$	$0,010 \pm 0,010$
25,00	$1126 \pm 159,5$	$96,44 \pm 5,377$	$138,9 \pm 0,019$	$0,282 \pm 0,019$
50,00	$1328 \pm 265,7$	$416,4 \pm 8,958$	$815,5 \pm 1,649$	$0,312 \pm 0,039$

A nagyobb molekulatömegű és koncentrációjú polimer oldatoknál a nyírási sebesség növekedésével a viszkozitás csökkenése figyelhető meg [60,98,143]. Ez a konklúzió az 1 mg/mL koncentrációnál töményebb M-HyA oldatoknál is levonható. A viszkozításban megfigyelhető változás egy alternatív magyarázata a lineáris polimer láncok nagy koncentráción megvalósuló „összegombolyodásához” köthető [91]. A gombolyagon belül feltételezhetően kialakuló másodrendű kölcsönhatások száma, melyek kialakulása a hőmozgástól is jelentősen függ, az egyre növekvő nyírósebesség következtében csökkenhet, amely kisebb viszkozitási értékeket eredményez. Ezt a változást tovább erősítheti a gombolyag lazulása/megszűnése eredményeként megfigyelhető áramlási irány szerinti orientáció.

A tömény M-HyA oldatok viszkoelasztikus viselkedésének megismeréséhez oszcillációs méréseket végeztünk 10 Hz állandó oszcillációs frekvencián, melynek eredményét a **36. ábra** foglalja össze. A tárolási (G') és veszteségi (G'') modulus értékek változásából meghatároztuk a gélek elasztikus/viszkózus sajátságát. Az alacsony nyírási deformációnál minden esetben a gélek elasztikus karaktere kerül előtérbe, míg magasabb értékeknél a viszkózus sajátság dominál ($G' < G''$). A 0,1-10,0 % tartományon a G' és G'' nem változik, így a nyírási deformáció nincs hatással a belső súrlódási viszonyokra. 10 % fölött a plasztikus /pszeudo-plasztikus viselkedésnek megfelelően a modulus értékek nem lineárisan változnak. Magas deformációknál a folyási pontot ($G' = G''$) követően a viszkózus viselkedés kerül előtérbe. A folyási pontok és kezdeti G''/G' arányából (a 4.3.1 alfejezet szerint $\tan\delta$) meghatározott fáziseltolódás értékei a **36.B. ábrán** láthatóak. A koncentráció növelésével a folyási pont hirtelen megnő, míg a fáziseltolódás csökken. A fáziseltolódás csökkenése a HyA alapú géles oldatoknál tapasztaltakat szerint [98,144], a rendszer viszkózus viselkedése egyre elasztikusabbá válik a koncentráció növekedésével.

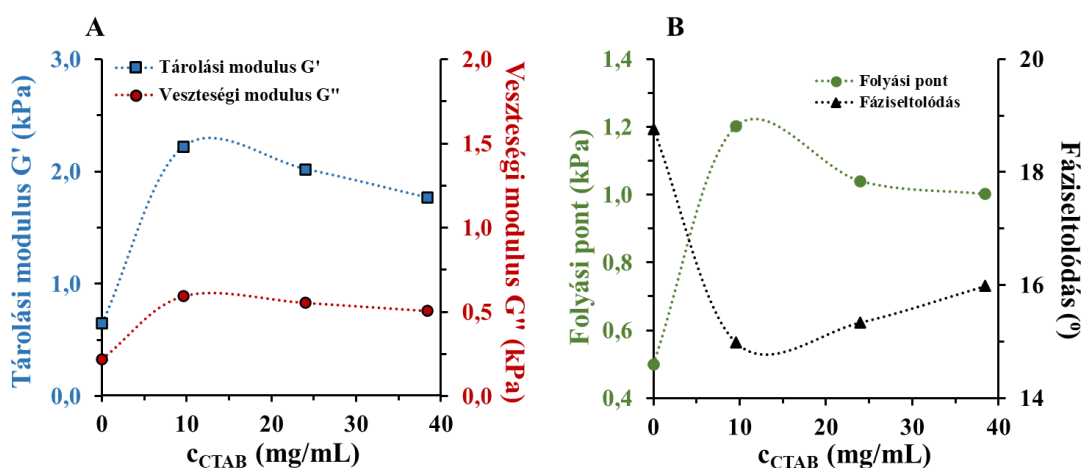


36. ábra: M-HyA hidrogélek (A) nyírási deformáció és (B) koncentráció függvényében meghatározott viszkoelasztikus paraméterei (A: tárolási modulus (G'), veszteségi modulus (G''); B: folyási pont, illetve fáziseltolódás a kezdeti G' és G'' értékek alapján)

A szakirodalomban talált CTAB-dal neutralizált és térhálósított HyA poliszacharidot frekvencia sepréses oszcillációs módszerrel vizsgálták [97,105]. Sz. Berkó és munkatársai meghatározták, hogy a térhálósított HyA esetén a frekvencia növelésével a gélek kiemelten viszkózus jellege elasztikusra vált [105]. Mivel csak a kiindulási és a 25 % -ban kereszt kötött mintát tanulmányozták, ezért jelentős konzekvenciát a térhálósítás mértékének hatásáról nem lehet levonni. T. Venerová és M. Pekař különböző molekulatömegű HyA, CTAB -dal történő neutralizálásánál, az előzővel megegyezően, kezdetben a viszkózus sajátság

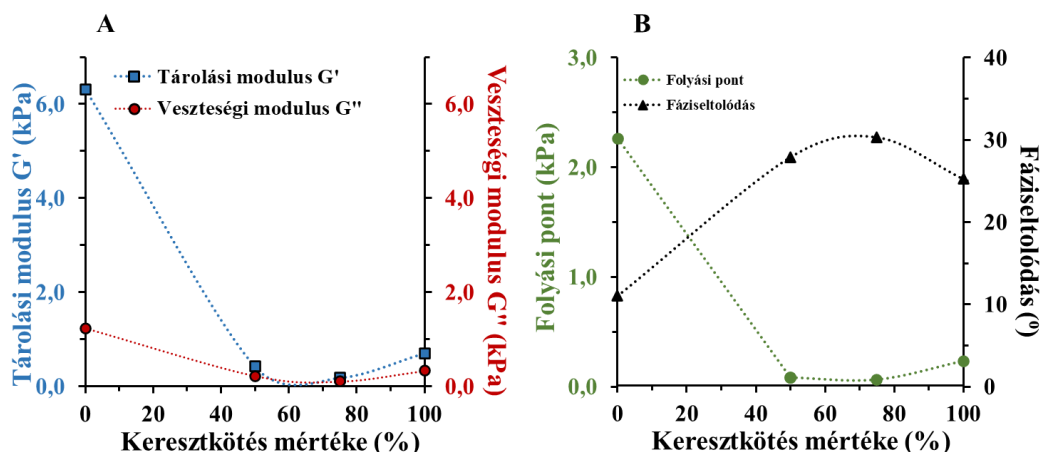
dominanciáját figyelték meg [97]. Az általunk is vizsgált kisebb molekulatömegű (300 kDa) HyA esetében nagyobb CTAB koncentrációknál folyási pontot nem tudtak meghatározni, illetve a méréseket kis kiindulási HyA koncentrációk és nagy mennyiségű stabilizátor felesleg mellett végezték el.

Ezt figyelembe véve, meghatároztuk a CTAB -dal neutralizált M-HyA és a cl-M-HyA viszkoelasztikus tulajdonságait a nyírási deformáció függvényében. A M-HyA/CTAB rendszerénél 50 mg/mL kiindulási M-HyA koncentrációt állítottunk be, ahol a neutralizálás mértéke százalékosan 0-100% között változott. A CTAB -dal részlegesen neutralizált M-HyA esetén a korábbi eredményeinkhez hasonló változásokat tapasztaltunk. Alacsonyabb deformációknál elasztikus, míg magasabb értékeknél a veszteségi modulus ($G'' > G'$) és így a viszkózus viselkedés dominál (**37. ábra**).



37. ábra: CTAB -dal neutralizált M-HyA gélek amplitúdó sepréses oszcillációs módszerrel meghatározott reológiai paraméterei (**A:** kezdeti tárolási (G') és veszteségi (G'') modulus; **B:** folyási pont és fáziseltolódás) ($c_{HyA} = 50$ mg/mL)

A kezdeti deformációknál a G' és a G'' ismételt konstans értéket mutat. Az egyes szakaszokra illesztett egyenesek tengelymetszetéből meghatározott tárolási és veszteségi moduluszt a **37.A. ábrán** mutatjuk be. Ezek ismeretében meghatároztuk a fáziseltolódás kiinduló értékeit (**37.B. ábra**). 50 mg/mL M-HyA koncentráció beállítása mellett, ha a stabilizátor koncentrációja <10 mg/mL, akkor a Newtoni viselkedés egyre elasztikusabbá válik, míg magasabb koncentrációknál (>10 mg/mL) a viszkózus sajátság kezd megerősödni. A **37.B. ábra** alapján a folyási pont a fáziseltolódással ellentétben a kezdeti hirtelen növekedést követően csökkenő tendenciát mutat. Hasonló körülmények között a térhálósított M-HyA mintákat is megvizsgáltuk (**38. ábra**).



38. ábra: Térhálósított HyA gélek amplitúdó sepréses oszcillációs módszerrel meghatározott reológiai paraméterei (A: kezdeti tárolási (G') és veszteségi (G'') modulus; B: folyási pont és fáziseltolódás)

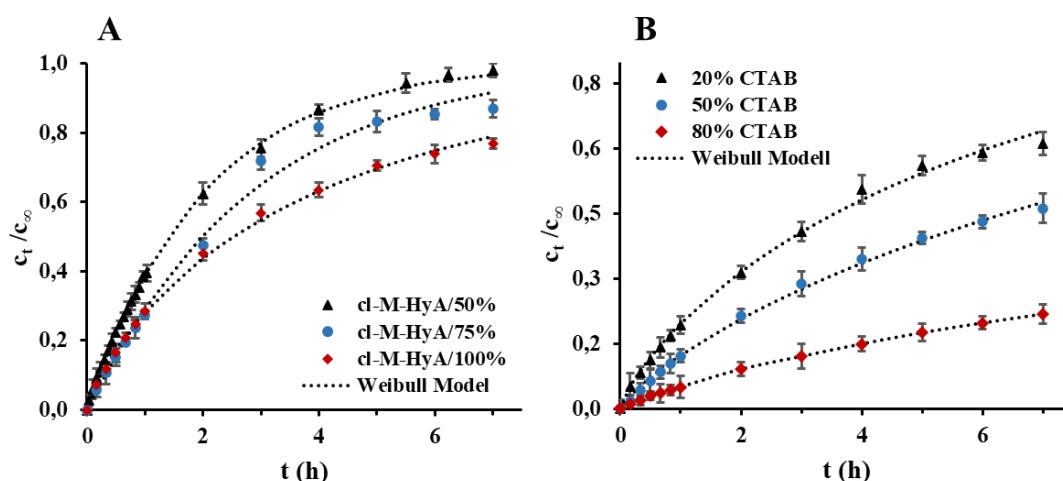
A kezdeti lineáris szakasz tárolási és veszteségi modulusokhoz tartozó konstans értékei a keresztkötés jelenlétében jelentősen csökkennek. Magasabb deformációknál a korábbi rendszerekkel megegyezően a veszteségi modulus kerül előtérbe. A meghatározott fáziseltolódás a neutralizált polimerekkel ellentétben nagymértékben növekszik. Ezek alapján a kezdeti elasztikusból egyre viszkózusabb viselkedés figyelhető meg. Összevetve a korábbi eredményeket megállapítható, hogy a keresztkötés jelenléte korlátozza a koherens rendszerek kialakulását. Azonos hatás a M-HyA/CTAB rendszerénél csak magasabb stabilizátor koncentrációknál figyelhető meg.

A kiindulási és a módosított (térhálósítás, neutralizálás) HyA poliszachariddal kapcsolatos viszkozitási tulajdonságok ismerete nagymértékben segíti a hatóanyag-tartalmú rendszerek kioldódási folyamatainak (pl. diffúzió, erózió) jellemzését. Ezek függvényében a következő lépésben a KP-tartalmú HyA alapú hordozókból a hatóanyag kioldódási tulajdonságait vizsgáljuk meg.

5.3.4. HyA alapú rendszerek *in vitro* hatóanyag kioldódási tulajdonságai

Munkánk során meghatároztuk a CTAB -dal hidrofóbizált és eltérő mértékben keresztkötött M-HyA alapú hordozó rendszerek hatóanyagleadó képességét. A mérések kivitelezéséhez modell vegyületként ketoprofent (KP) használtunk. A kioldódási méréseket 50 %, 75 % és 100 % -ban keresztkötött, illetve 20, 40 és 80 % -ban CTAB -dal neutralizált M-HyA alapú rendszereknél végeztük el (39. és M50. ábra). Minden esetben a kapszulázási hatékonyság 95,0-95,5 % -os volt az alkalmazott KP vegyület esetén. A rögzített kioldódási görbék folytonos kioldódási profilt mutatnak. Összehasonlítva a kétféle rendszert

megállapítható, hogy a cl-M-HyA alapú hordozók alkalmazásával a KP visszatartási képessége a vizsgált 7 órás időtartományon kisebb (**39.A. ábra**). Megállapítható továbbá, hogy a térhálósítás mértékének növelésével a visszatartás nő. A cl-M-HyA/100% rendszer vonatkozásában 6 óra után a KP mennyiségének $\sim 80\%$ -a, míg cl-M-HyA/50% esetén közel 100% felszabadul. Ezzel ellentétben a M-HyA/CTAB rendszereknél a 20% -ban CTAB-dal neutralizált hordozónál $\sim 60\%$, míg magasabb értékeknél akár $\sim 20\%$ -os hatóanyag felszabadulás is elérhető (**39.B. ábra**).



39. ábra: (A) A KP-tartalmú térhálósított- és (B) CTAB -dal neutralizált M-HyA hordozókból a KP kioldódási görbéi (pontokkal) és a mérési pontokra Weibull kinetikai modellel illesztett görbék (szaggatott vonal) ($T = 25\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,4$, $0,9\text{ w/w\% NaCl}$, PBS közeg)

A kioldódási görbéket különböző kinetikai modellekkel megillesztettük. A M-HyA/CTAB rendszer esetén az R^2 szerinti legjobb eredményt a Weibull, míg a második legjobbat a Korsmeyer-Peppas modell adta (**10. táblázat**). Ettől eltérően a térhálósított M-HyA -nál a legjobb illesztést a Weibull és a második legjobbat elsőrendű modell mutatta. Attól függetlenül, hogy a Weibull modellhez képest a Korsmeyer-Peppas modell rosszabbul írja le a változásokat, az egyenlettel meghatározott kinetikai paraméterek a folyamatok jellemzése szempontjából jelentős információval bírnak. A hatóanyag felszabadulását jellemző diffúziós oldódási index (n) a CTAB-dal hidrofóbizált HyA esetén felületaktív anyag mennyiségének növelésével $0,60$ (20% CTAB), $0,70$ (50% CTAB) és $0,75$ (80% CTAB) értékre emelkedik. Ebből látható, hogy a KP felszabadulását a diffúziós és eróziós folyamatok egyaránt szabályozzák (nem-Fick kioldódás). A korábbi ζ -potenciállal, turbiditással és részecskemérettel kapcsolatos megfigyelések szerint a kisebb

menyiségben jelenlévő elektrosztatikusan adszorbeált CTAB -nál a hatóanyag felszabadulás gyorsabban és diffúzió kontrolláltabban játszódik le. A magasabb molarányok mellett töltéskompenzált M-HyA poliszacharidnál a megnövekedett szerkezeti változások miatt a hatóanyag kioldódás lelassul és az erózió szerepe megnő.

A térhálósított polimereknél ez az effektus nem figyelhető meg. A diffúziós-oldódási index, függetlenül a keresztkötés mértékétől, átlagosan 0,55-0,61 értéket vesz fel, amely megközelíti a Fick I. féle folyamatokhoz tartozó $n = 0,42$ határt, így a hatóanyag felszabadulásánál az erózió mellett a diffúzió dominál és ezt a befolyást a keresztkötés mértéke nem módosítja.

10. táblázat: A KP-tartalmú térhálósított és CTAB -dal neutralizált M-HyA rendszerek kioldódási görbéire illesztett kinetikai modellek (12-14. egyenlet) megfelelő paraméterei

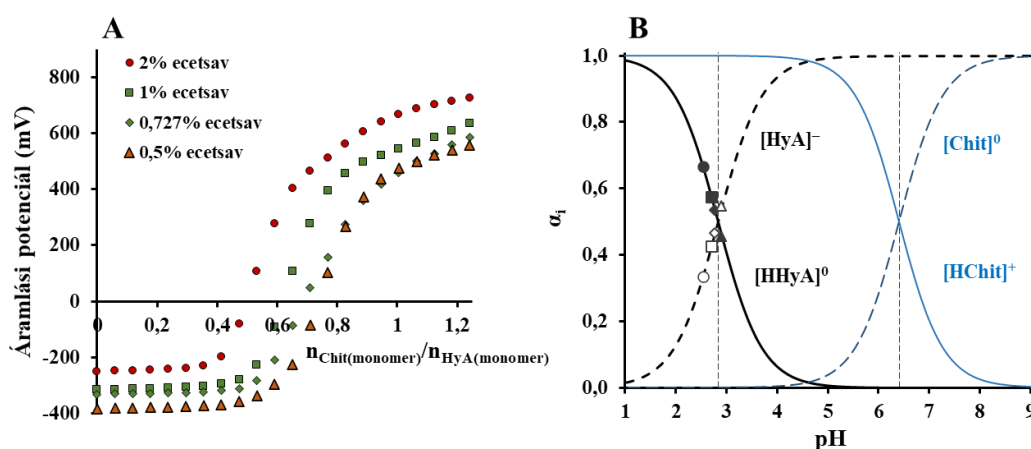
Modell	Elsőrendű		Korsmeyer-Peppas			Weibull		
	k (min ⁻¹)	R ²	k _m (min ⁻ⁿ)	n	R ²	a	b	R ²
20 % CTAB	0,16	0,9881	524	0,604	0,9819	0,0003	0,794	0,9971
50 % CTAB	0,10	0,9892	149	0,698	0,9941	0,0002	0,821	0,9978
80 % CTAB	0,04	0,9907	41	0,748	0,9989	0,0001	0,795	0,9995
cl-HyA/ 50%	0,50	0,9995	1401	0,554	0,9799	0,0001	0,991	0,9995
cl-HyA/ 75%	0,34	0,9977	698	0,613	0,9783	0,0001	1,010	0,9977
cl-HyA/ 100%	0,26	0,9901	1126	0,550	0,9886	0,0005	0,795	0,9986

5.4. Hialuronsav - kitozán poliszacharid alapú hordozó rendszerek előállítása és jellemzése

5.4.1. HyA-Chit között kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatások jellemzése

Doktori munkám során a CTAB -dal neutralizált M-HyA rendszerek tanulmányozása mellett megkíséreltük elektrosztatikus kölcsönhatások révén kialakítható hialuronsav - és kitozán ($\beta(1 \rightarrow 4)$ kötött *D*-glükózamin (deacetilezett) (és nem teljes deacetilezés esetén *N*-acetyl-*D*-glükózamin) egységekből felépülő kationos poliszacharid [145]) alapú polielektrolit komplexek (PEC), mint potenciális hordozóként alkalmazható kolloid részecskék előállítását is. Jól ismert, hogy a poliszacharidok töltése a pH függvényében jelentősen változhat, ami egy hordozó rendszer esetében a kioldódási folyamatokat is befolyásolhatja [146]. Ezen kívül a PEC -ből kialakítható részecskék mérete és stabilitása is jelentősen eltérhet az előállításkor használt közeg pH -jától. Ezen folyamatok részletesebb

megismerése érdekében, meghatároztuk a nagy molekulatömegű HyA -ból (H-HyA: $M_w = 1500-1800$ kDa) és a közepes molekulatömegű Chit -ból (M-Chit: $M_w = 190-310$ kDa) felépülő interpolimer komplexek pH szabályozott neutralizálással kapcsolatos sajátságait, melyhez első lépésben töltéstitrálási méréseket alkalmaztunk (**40. ábra**). A méréseket 2,00 (pH= 2,53), 1,00 (pH= 2,70), 0,727 (pH= 2,77) és 0,500 V/V% -os (pH= 2,91) ecetsavas közegben végeztük el. A titrálási görbék kezdeti áramlási potenciáljának növekvő értékét a közegben jelen lévő ecetsav okozza. A M-Chit H-HyA -hoz történő folyamatos adagolásával egy kis mértékű lineáris növekedés figyelhető meg. Ezen a tartományon a H-HyA negatív töltése a M-Chit pozitív töltését olyan szinten tudja semlegesíteni, hogy a rendszer elektrosztatikus stabilitása csak kis mértékben változik. Az áttöltési pont elérése körül az áramlási potenciál értékek hirtelen ugrást mutatnak, mivel a nagy mennyiségben jelenlévő Chit töltését a HyA már nem tudja szabályozni. Ekkor az elektrosztatikus stabilitás lecsökken, amelyet a rendszer aggregációja követ. Az áttöltési pontot követően a nagy Chit túlsúly miatt az áramlási potenciál pozitív értéket vesz fel. Az ecetsav mennyiségének csökkenésével (pH növelése) a lineáris szakasz kis mértékben elnyúlik, míg az áttöltési pont, a vártak megfelelően, a nagyobb értékek felé eltolódik.

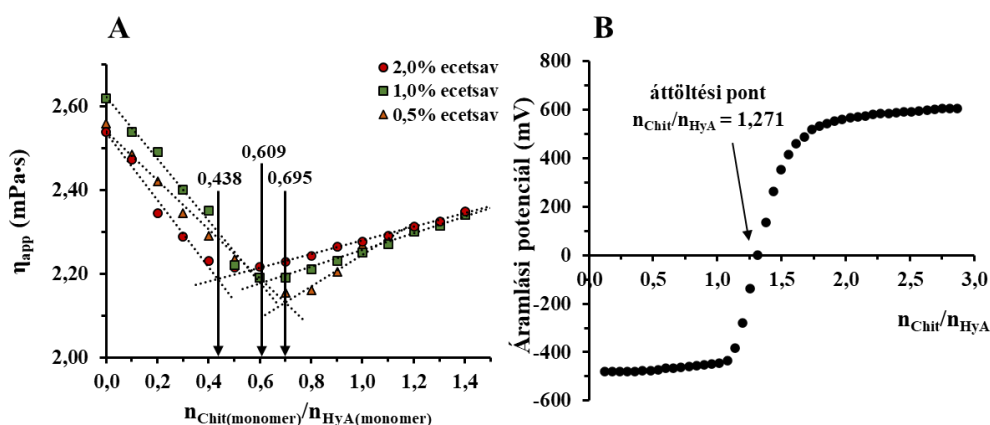


40. ábra: (A) A M-Chit-nal titrált H-HyA áramlási potenciál görbéi különböző ecetsavas közegben ($V_{\text{HyA, titrálandó}} = 10$ mL, $c_{\text{HyA, titrálandó}} = 0,045$ mg/mL, $c_{\text{Chit}} = 0,091$ mg/mL) és (B) a poliszacharidok koncentrációeloszlás görbéi ($c_{\text{HyA}} = 0,040$ mg/mL, $c_{\text{Chit}} = 9,0$ µg/mL). Az eloszlás görbéken szereplő szimbólumok az adott ecetsavas közeg pH értékét mutatják (●: 2,00 V/V%; ■: 1,00 V/V%; ◆: 0,727 V/V%; ▲: 0,500 V/V%)

A pontos áttöltési pontok meghatározásához a felvett titrálási görbéket a módosított Boltzmann egyenlettel (**4. egyenlet**) illesztettük. A számolások alapján a 0 mV-nál meghatározott monomer mólarányok $0,496 \pm 0,033$ (2,00 % ecetsav); $0,622 \pm 0,018$ (1,00

% ecetsav); $0,696 \pm 0,022$ (0,727 % ecetsav); $0,738 \pm 0,015$ (0,500 % ecetsav) folyamatosan nőnek.

A PEC rendszerek áttöltési és viszkozitási tulajdonságait a 5.3.2 *alfejezetben* már megismert koncentráció függő, állandó nyírófeszültségen (300 1/sec) elvégzett reológiai mérésekkel is elemeztük (**41.A. ábra**). Az eredményeket a rendszer hígulásával minden esetben korrigáltuk. A M-HyA/CTAB rendszerhez hasonlóan a látszólagos viszkozitás a M-Chit mennyiségének növelésével csökken, amelyet a H-HyA neutralizálása miatt lejátszódó folyamatok megtörnek. A szakaszokra illesztett egyenesek metszéspontjából származtatott töltésszemlegesítés, az áramlási potenciál méréseknél tapasztaltakkal megegyezően, a pH függvényében tolódik $\sim 0,438$ $n_{\text{Chit}}/n_{\text{HyA}}$ monomer molarányról (2,0 % ecetsav) $\sim 0,695$ -re (0,5 % ecetsav).



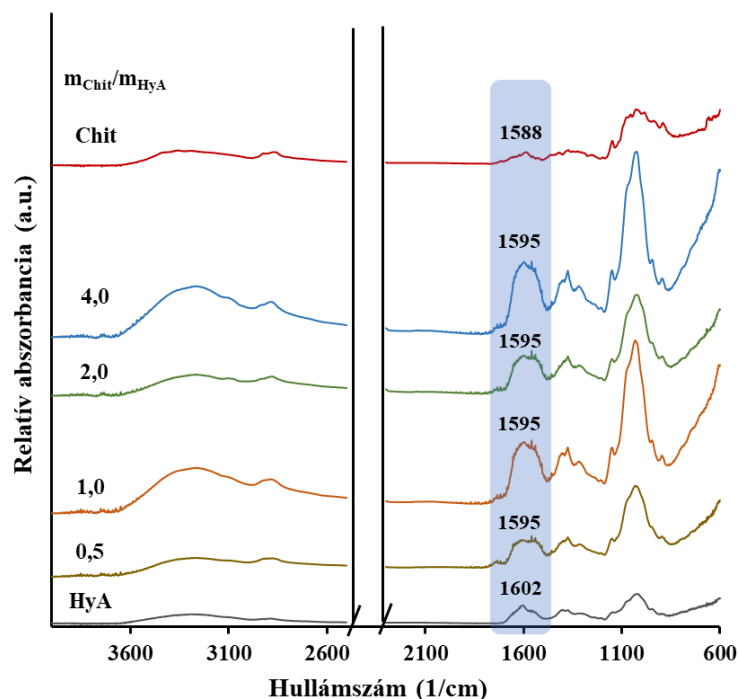
41. ábra: (A) A M-Chit - H-HyA rendszer látszólagos viszkozitásának változása a $n_{\text{Chit}}/n_{\text{HyA}}$ monomer arány és az ecetsav koncentráció függvényében ($V_{\text{HyA, titrálandó}} = 19$ mL, $c_{\text{HyA, titrálandó}} = 0,1$ mg/mL, $c_{\text{Chit, titráló}} = 2$ mg/mL) és (B) a H-HyA áramlási potenciáljának változása $\text{pH} \approx 4,5$ ecetsav-acetát pufferes közegben ($H\text{-HyA: } c = 0,045$ mg/mL, $M\text{-Chit: } c = 0,091$ mg/mL)

A reológiai és töltéstitrálási vizsgálatoknál meghatározott értékek jelentősen eltérnek az 1:1 molaránytól, melyet a M-HyA/CTAB rendszer eredményeire alapozva várnánk. Ennek oka, hogy ezen a tartományon a H-HyA polimer láncon lévő karboxilcsoportok részben protonált/deprotonált állapotban vannak ($\text{pK}_a = 2,90$ [100]) (**40.B. ábra**), illetve a M-Chit -nál ($\text{pK}_a = 6,41$ [147]) a nem teljes deacetilezítés miatt a pozitív töltéssel rendelkező aminos csoportok csak kb. 80 % -a szabad. Az áramlási potenciál változását $\text{pH} = 4,5$ esetében is meghatároztuk, ahol a H-HyA és a M-Chit közel 100% -ban rendre deprotonált és protonált formában vannak és már csak a M-Chit deacetilezési fokának mértékével kell számolni. A **40.B. ábrán** bemutatott eredmények alapján az áttöltés

$n_{\text{Chit}}/n_{\text{HyA}} \sim 1,271$ monomer molarányoknál következik be (polimer tömegarányra nézve $m_{\text{Chit}}/m_{\text{HyA}} = 0,537$), mely jó egyezésben van azzal, hogy a pozitív töltéssel rendelkező aminoszoprtok csak kb. 80% -a szabad.

A HyA/Chit komplex hordozó rendszerek előállítására előtt, a makromolekulák közötti kölcsönhatások mértékének feltérképezése érdekében különböző $m_{\text{Chit}}/m_{\text{HyA}}$ tömegarányok mellett 1 % ecetsavas közegben elkészített mintákat tisztítás és liofilizálás után FT-IR és termoanalitikai (TG, DTG, DSC) méréseket is elvégeztük. (Tisztításkor a mintákat 20 mL -re felhígítottuk, 15 percig 12000 rpm fordulatszámon centrifugáltuk, majd a felülúszót eltávolítottuk. Ezt az eljárást háromszor megismételtük.)

A különböző poliszacharid tömegarányú H-HyA/M-Chit komplexek IR spektrumai csak kismértékben térnek el a kiindulási polimerek megfelelő spektrumaitól, ezenkívül újabb csúcsok megjelenése nem azonosítható (42. ábra).

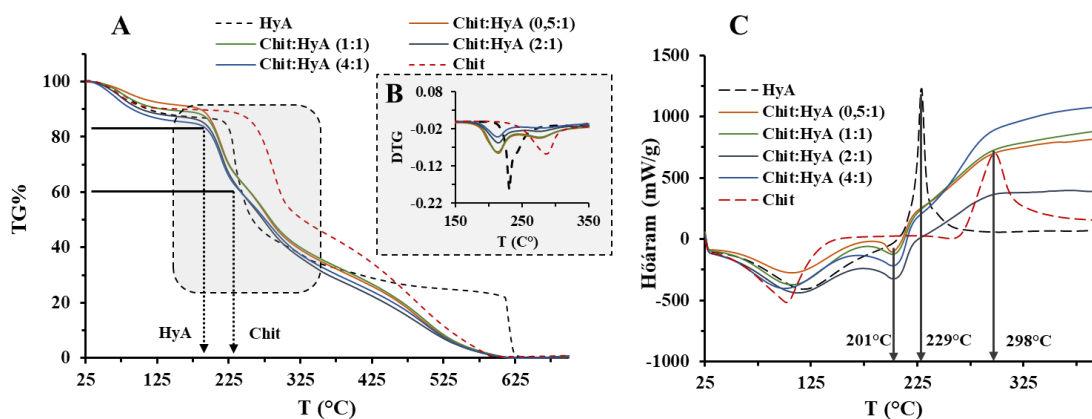


42. ábra: A M-Chit, a H-HyA és a különböző tömegarányok mellett készített és liofilizált H-HyA/M-Chit komplexek FT-IR spektrumainak megfelelő részletei ($V_{\text{össz}} = 10 \text{ mL}$, $c_{\text{HyA, törzs}} = 2 \text{ mg/mL}$, $c_{\text{Chit, törzs}} = 2 \text{ mg/mL}$, $c_{\text{ecetsav}} = 1 \text{ (v/v)\%}$)

Ez arra utal, hogy a polimerek között erősebb kölcsönhatás nem alakul ki. A legnagyobb változás a H-HyA karboxilátszoprtjához tartozó C-O aszimmetrikus nyújtórezgés ($1610\text{-}1540 \text{ cm}^{-1}$) és M-Chit aminoszoprtjához tartozó N-H deformációs rezgéseknél ($\sim 1585 \text{ cm}^{-1}$) látható [133,148]. A kiindulási polimerek spektrumát nézve a kezdeti H-HyA karboxilát - (1602 cm^{-1}) és a M-Chit aminoszoprtok (1588 cm^{-1}) a

komplexeknél egy 1595 cm^{-1} -nél megjelenő közös széles csúcsban összeolvadnak. Ez másodrendű kölcsönhatások kialakulására utalhat. A komplexek elnyelési sávjainak relatív abszorbancia arányai a kezdeti polimer tömegarányokkal nem változnak, így a rendszerben kialakuló H-HyA/M-Chit minták összetétele megegyezik. Ez azt is bizonyítja, hogy a feleslegben lévő Chit a már kialakuló polielektrolit komplexekhez nem kötődik.

A TG mérések során megfigyelhető tömegváltozások a kiindulási tiszta polimereknél és a H-HyA/M-Chit komplexeknél eltérnek, de a $m_{\text{Chit}}/m_{\text{HyA}}$ tömegarány függvényében a görbék szinte azonos lefutást mutatnak (**43.A. ábra**). A tömeg kezdeti csökkenését a nagyrészt fizikailag megkötött víz eltávozása okozza. A poliszacharid komplexeknél $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ig a megkötött víz mennyisége 9,7 % ($m_{\text{HyA}}:m_{\text{Chit}}= 1:0,5$), 11,6 % ($m_{\text{HyA}}:m_{\text{Chit}}= 1:1$), 14,0 % ($m_{\text{HyA}}:m_{\text{Chit}}= 1:2$) és 15,5 % ($m_{\text{HyA}}:m_{\text{Chit}}= 1:4$) folyamatosan nő a M-Chit mennyiségével. A vízvesztés után a polimerek degradációs folyamatai játszódhatnak le. A hőmérséklet pontos meghatározásához a DTG görbéket használtunk.



43. ábra: A HyA, Chit és a különböző tömegarányok mellett elkészített és liofilizált HyA-Chit komplexek (A) TG, (B) DTG és (C) DSC görbéi ($V_{\text{össz}} = 10\text{ mL}$, $c_{\text{HyA},\text{törzs}} = 2\text{ mg/mL}$, $c_{\text{Chit},\text{törzs}} = 2\text{ mg/mL}$, $c_{\text{ecetsav}} = 1\text{ (v/v)\%}$)

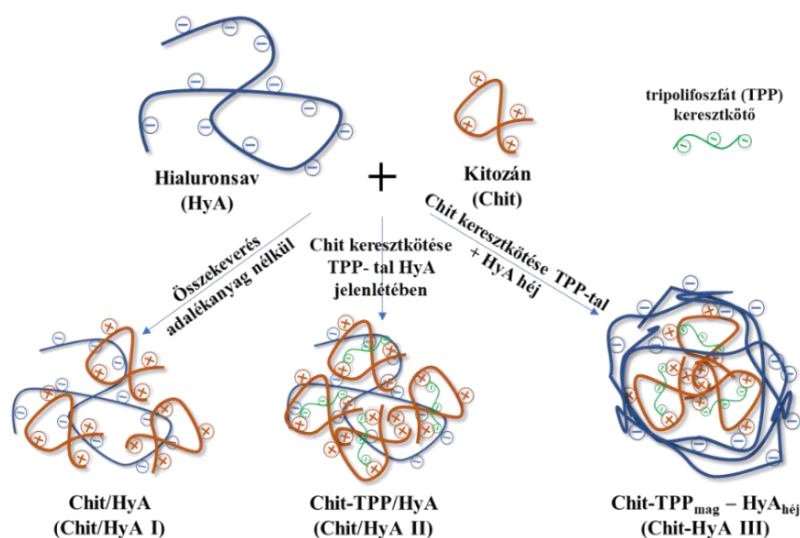
A **43.B. ábrán** a mintákban lévő H-HyA és M-Chit jelenléte jól azonosítható. A H-HyA és M-Chit makromolekulákhoz köthető degradációk ($T_{d,\text{HyA}} = 180\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $T_{d,\text{Chit}} = 245\text{ }^{\circ}\text{C}$) a kiindulási polimerekéhez képest nagymértékű eltolódást mutatnak ($T_{d,\text{HyA}} = 205\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{d,\text{Chit}} = 221\text{ }^{\circ}\text{C}$), melyet a M-Chit–H-HyA között kialakuló kölcsönhatások okozhatnak. Az arányok módosításával a hőmérsékletek nem változnak. A TG görbékből meghatároztuk a kizárólag H-HyA poliszacharidhoz tartozó tömegváltozás százalékos arányát ($180\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $245\text{ }^{\circ}\text{C}$ között), ahol minden esetben $\sim 26\text{ \%}$ -ot kaptunk. A víz tömegének kezdeti minta tömegéből történő kivonásával ($m_{\text{minta}} - m_{\text{víz}}$) a komplexben lévő tisztán H-HyA -hoz ($180\text{ }^{\circ}\text{C}$ -tól $245\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ig)

és H-HyA/M-Chit keverékhez (245 °C -tól 650 °C -ig) tartozó százalékos tömegváltozásokat is összehasonlíthatjuk. Az eredmények szerint a 245 °C -ig a tömeg 30 % -kal és 245 °C -tól 650 °C -ig 70 % -kal csökken függetlenül a $m_{\text{Chit}}/m_{\text{HyA}}$ tömegaránytól. Ez egyértelmű bizonyítéka lehet annak, hogy a komplexek összetétele megegyezik.

A minták DSC mérésénél az első endoterm csúcs a víz elpárolgásához rendelhető, amit a poliszacharidok degradációja követ (**43.C. ábra**). A görbék lefutása megegyezik, így a TG és FT-IR módszerekhez hasonlóan a DSC is igazolja a komplexek azonos összetételét. Az alkalmazott tiszta makromolekulákkal ellentétben a komplex minták degradációjánál egy endoterm csúcs jelenik meg 200 °C hőmérsékleten. Ez a komplexek és az elektrosztatikus kölcsönhatások kialakulását egyértelműen bizonyítja. A 298 °C -nál megfigyelhető exoterm csúcs hiánya arra utal, hogy az előállításakor beállított töltésarány szerinti M-Chit felesleget a minták nem tartalmaznak, mely a tisztítási lépés sikerességét igazolja. Az eredmények alapján a két makromolekula fizikai keveréknek jelenléte kizárható és valóban hatóanyag hordozóként alkalmazható PEC képződik.

5.4.2. HyA-Chit hatóanyag hordozó rendszerek előállítása és jellemzése

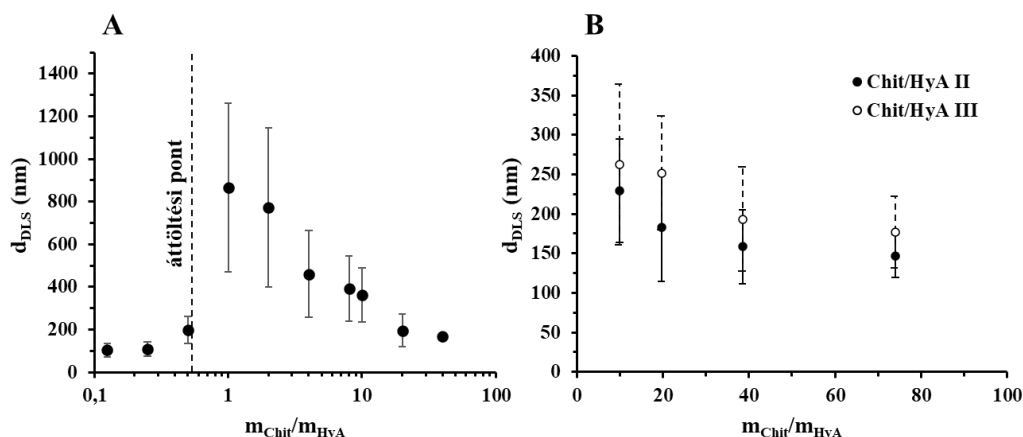
A hialuronsav-kitozán között kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatás tanulmányozását követően különböző technikákat alkalmazva három különböző szerkezetű, hatóanyag hordozóként is alkalmazható poliszacharid alapú nanorészecskét állítottunk elő, melyek sematikus ábrája a **44. ábrán** látható. Első esetben egyéb komponens hozzáadása nélkül a tisztán elektrosztatikusan kompenzált Chit/HyA (továbbiakban Chit/HyA I. jelölésű) komplexeket hoztunk létre a poliszacharid oldatok fizikai keverésével, mely rendszerek szerkezeti karakterizálásával az *5.4.1 fejezetben* foglalkoztunk részletesen. Ezek után tripolifoszfáttal (TPP) ionosan keresztkötött Chit-TPP/HyA (továbbiakban Chit/HyA II.) és mag-héj szerkezetű Chit-TPP_{mag}/HyA_{héj} (továbbiakban Chit/HyA III.) részecskéket is előállítottunk különböző Chit:HyA tömegarányokon. Chit/HyA II. esetén a Chit oldatot HyA/TPP oldatkeverékbe csepegtettük folyamatos kevertetés mellett, míg a Chit/HyA III. jelölésű rendszernél először a keresztkötött Chit magot (Chit/TPP_{mag}) alakítottuk ki, majd azt a HyA héj kialakítása érdekében a megfelelő koncentrációjú H-HyA oldatba adagoltuk. A nagy molekulatömegű HyA (H-HyA: $M_w = 1500-1800$ kDa) alkalmazása mellett Chit/HyA I. -nél közepes (190-310 kDa), míg Chit/HyA II.- és III.-nál nagy (310-375 kDa) molekulatömegű Chit használtunk.



44. ábra: A három különböző típusú Chit/HyA hordozó előállításának és a lehetségesen képződő részecskék szerkezetének sematikus ábrázolása

Annak érdekében, hogy a H-HyA deprotonált formában és a Chit még protonált állapotban legyen, a Chit-nál pH= 4,4-4,7 ecetsav-acetát pufferes, míg a HyA -nál Milli-Q vizes közeget alkalmaztunk. A hidrodinamikai átmérő és a méreteloszlásának meghatározása érdekében DLS méréseket végeztünk.

A Chit/HyA I. esetén megfigyeltek szerint elektrosztatikus kompenzációval alacsony hidrodinamikai átmérővel rendelkező részecskék képződése figyelhető meg (**45.A. ábra**). $m_{\text{Chit}}/m_{\text{HyA}} = 80\text{-}40$ tömegarány tartományban, ahol a M-Chit koncentrációja a H-HyA- hoz képest nagyobb, részecskék kialakulása nem volt detektálható. Az arányokat tovább csökkentve ($m_{\text{Chit}}/m_{\text{HyA}} = 40\text{-}20$) a rendszerben kis hidrodinamikai átmérővel rendelkező részecskék jelennek meg ($d_{\text{DLS}} \approx 168 \text{ nm}$ ($m_{\text{Chit}}/m_{\text{HyA}} = 40$), $d_{\text{DLS}} \approx 195 \text{ nm}$ ($m_{\text{Chit}}/m_{\text{HyA}} = 20$)). A $m_{\text{Chit}}/m_{\text{HyA}} = 20\text{-}1$ közötti tömegarányoknál a töltéssemlegesítési ponthoz ($m_{\text{Chit}}/m_{\text{HyA}} = 0,537$) közeledve a részecskeméret ($d_{\text{DLS}} \approx 195 \text{ nm}$ -ről 864 nm -re) és a rendszer polidiszperzitása növekvő tendenciát mutat. Ennek legfőbb oka, hogy a neutralizálási pontnál a részecskék töltése semlegesé válik, amit aggregációs folyamatok követnek. Az áttöltési pont után H-HyA feleslegénél is megvizsgáltuk a lehetségesen képződő részecskék méretét ($m_{\text{Chit}}/m_{\text{HyA}} = 0,500\text{-}0,125$), ahol ismételt alacsony ($d_{\text{DLS}} = 103\text{-}199 \text{ nm}$) értékeket kaptunk. Ez arra utal, hogy az orvosi biológiai felhasználásra alkalmas nanorészecskék képződése csak jelentős M-Chit vagy H-HyA többlet esetén kedvezményezett.



45. ábra: (A) Chit/HyA I. ($m_{\text{Chit}}/m_{\text{HyA}} = 0,125-1,00$; $c_{\text{Chit}} = 0,091$ mg/mL, $V_{\text{Chit}} = 0,5-4,0$ mL, $c_{\text{HyA}} = 0,042$ mg/mL, $V_{\text{HyA}} = 8,72$ mL; $m_{\text{Chit}}/m_{\text{HyA}} = 4-80$: $c_{\text{Chit}} = 0,364$ mg/mL, $V_{\text{Chit}} = 4,0$ mL, $c_{\text{HyA}} = 0,134-0,0067$ mg/mL, $V_{\text{HyA}} = 2,72$ mL; HyA: Milli-Q vizes közeg, Chit: pH $\approx 4,5$), illetve (B) Chit/HyA II. és III. részecskék hidrodinamikai átmérőjének változása a Chit:HyA tömegarány függvényében ($c_{\text{Chit}} = 0,30$ mg/mL, $c_{\text{TPP}} = 0,15$ mg/mL, $c_{\text{HyA}} = 3,9-31$ $\mu\text{g/mL}$; Chit/HyA II: $V_{\text{össz}} = 4,73$ mL, Chit/HyA III: $V_{\text{össz}} = 4$ mL)

S. Huang és munkatársai által előállított elektrosztatikusan kompenzált Chit/HyA nanorészecskéknél a 100 nm körüli átmérőt csak kis molekulatömegű poliszacharidokkal (10 kDa -os HyA és 100 kDa-os Chit) tudták kivitelezni korábban [149]. A kizárólag elektrosztatikus kompenzáción alapuló eljárásához képest, ahol főként laza kolloid szerkezet alakul ki, a Chit/HyA II. és III. tartalmú minták esetében a TPP keresztkötő ágensnek köszönhetően sokkal monodiszperzebb és könnyebben méretszabályozható részecskék képződnek (**45.B. ábra**). $m_{\text{Chit}}/m_{\text{HyA}} = 80-10$ tömegarányok között a három módszert összehasonlítva kitűnik, hogy a legkisebb hidrodinamikai átmérővel a Chit/HyA II. rendelkezik. A Chit/HyA III. esetében a kezdeti Chit-TPP mag méretéhez ($d_{\text{DLS}} = 147 \pm 45$ nm) képest az átmérők nagyobbak, ami alapján a részecskék H-HyA héjjal történő bevonása sikeresnek bizonyult. Ennek a szerkezetnek a kialakulása okozza a Chit/HyA III. típusú részecskének a Chit/HyA II.-vel szembeni nagy átlagos részecskeméretét is. A Chit/HyA I.-hez hasonlóan a növekvő H-Chit arálynak köszönhetően a részecskeméret folyamatosan csökken (Chit/HyA II: $d_{\text{DLS}} = 230$ -tól 146 nm-ig; Chit/HyA III: $d_{\text{DLS}} = 262$ nm -tól 177 nm -ig). Fontos megjegyezni, hogy a mag-héj struktúra elérésekor az előre kialakított H-Chit magon kevesebb szabad kötőhely érhető el, mint a Chit/HyA I. és II. -nél. Ennek következtében az aggregációs folyamatok már 10 w/w% -os H-HyA esetén elindulnak.

6. Összefoglaló

A (bio)polimer alapú nanoszerkezetű hatóanyag hordozó rendszerek, széleskörű alkalmazhatóságuknak köszönhetően, az elmúlt néhány évtizedben egyre nagyobb szerepet töltenek be gyógyszerészeti és nanomedicina kutatási területeken is. A hordozók kialakítását szabályzó kísérleti paraméterek és előállítási technikák variálásával minden egyes gyógyszerkészítményre optimalizált rendszert állíthatunk elő, amelynek eredményeként mind a hatóanyag felszabadulás mind a hatékonyság kontrollálhatóvá válik.

Néhány éve kutatócsoportunkban kitüntetett szereppel bír a főként szérum fehérje alapú hatóanyag hordozó koloid részecskék előállítása, ahol a fő cél neuroaktív vegyületek vér-agy gáton való transzportjának megvalósítása. A kutatásokat folytatva 2017. őszén kezdtem el munkámat egy újonnan elnyert GINOP-2.3.2 pályázat keretein belül. Kiemelt feladatom volt elsősorban polimer és poliszacharid alapú, új típusú hatóanyag hordozó rendszerek tervezése és optimalizálása reprodukálható szintézisek kidolgozásán keresztül. Sikeresen kiviteleztek makromolekulás koloidokból (PLA, PLGA, HyA, Chit) felépülő, nanoszerkezetű hordozó rendszerek kialakítását, ahol tanulmányoztuk az alkalmazott hordozók tulajdonságainak (pl. hidrofilitás, szerkezet, felületi töltés) és a modellként alkalmazott eltérő hidrofilitású, szerkezetű és töltésű kismolekulák kapszulázási hatékonyságára gyakorolt hatását. Meghatároztuk, hogy a képződő részecskék méretét, szerkezetét, morfológiáját milyen kísérleti tényezők befolyásolják. Továbbá, ahol lehetőség adódott, a hatóanyag felszabadulás kinetikáját is tanulmányoztuk.

Doktori munkám első lépéseként hatóanyag hordozóként alkalmazható PLA és különböző laktid / glikolid arányú PLGA kopolimereket állítottam elő gyűrűfelnýtásos polimerizációs eljárással, melynek sikerességét DSC és FT-IR spektroszkópiás mérésekkel igazoltuk. A fényszórási kísérletekkel és a precipitációs titrálási görbékkel alátámasztottuk, miszerint az általunk előállított PLA/ PLGA polimerek alacsony molekulatömeggel és szűk méreteloszlással rendelkeznek. A peremszög mérések által jellemzett nedvesedési tulajdonságok a kereskedelmi forgalomban kapható ugyanezen polimerek peremszög értékeivel jó egyezést mutattak. Mindezek mellett igazoltuk, hogy a szintetizált kopolimerek hidrofilitása szisztematikusan nő a glikolid mennyiségének növekedésével (PLA: $74,55 \pm 0,82^\circ$, PLGA75: $70,50 \pm 0,25^\circ$, PLGA65 $68,18 \pm 0,61^\circ$).

A szintetizált PLA/PLGA makromolekulákból nanoprecipitációs módszerrel koloid mérettartományú részecskéket állítottunk elő. Megállapítottuk, hogy a részecskék hidrodinamikai átmérője, szerkezete és stabilitása az alkalmazott oldószerek (1,4-dioxán,

aceton) anyagi minőségével (forráspont, sűrűség különbség) és felületaktív anyagként alkalmazott molekulák (PLUR, PVA, CTAB) kémiai szerkezetével (molekulatömeg, töltés) kontrollálható. DLS mérések és a rögzített TEM felvételek által igazoltuk, hogy az 1,4-dioxánhoz képest kisebb sűrűségű és forráspontú aceton, mint szerves fázis, alkalmazásával 10-70 nm -rel kisebb részecskék állíthatók elő. A stabilizátorként alkalmazott molekulák tanulmányozásánál megállapítottuk, hogy a legnagyobb hidrodinamikai átmérőt és ζ -potenciál értéket a pozitív töltésű funkciós csoporttal rendelkező CTAB esetén (pl. ~ 261 nm; $\zeta_{\text{tisztított}} \approx -53$ mV (PLGA75)), míg a legkisebb a PLUR felhasználásával érhető el (pl. ~ 180 nm, $\zeta_{\text{tisztított}} \approx -88$ mV (PLGA75)). Ezen eredmények alapján kijelenthető, hogy a stabilizátor megfelelő kiválasztásával a gyógyszerhordozó részecskék mérete tovább csökkenthető. A PLA/PLGA alapú makromolekulás kolloidok hatóanyag kapszulázási képességének tanulmányozásakor megállapítottuk, hogy eltérő hidrofilítási tulajdonsággal rendelkező vegyületek (TPGS > KP > TP) esetében a molekulák hidrofilitásának csökkenésével a mag-héj szerkezetű hatóanyag hordozó rendszerek képződése is lehetséges, mely a legkevesbé vízzoldékony TP esetén egyértelműen igazolható.

A mag-héj struktúrával rendelkező TP-tartalmú PLA részecskénél megállapítottuk, hogy a hordozó, a hatóanyag és a stabilizátor koncentráció arányai a szerkezet kialakulását és a kapszulázási hatékonyságot nagymértékben befolyásolja. A TEM felvételekkel igazoltuk, hogy az egyes komponens koncentrációk csökkenésével a mag-héj struktúra kialakulása kedvezőtlené válik. A részecskeméret és a szerkezet szerint optimalizált koncentráció paraméterek mellett ($c_{\text{PLA/PLGA}} = 10$ mg/mL és $c_{\text{TP}} = 2,5$ mg/mL (1 mL aceton fázis), $c_{\text{PLUR}} = 0,1$ mg/mL (10 mL vizes fázis)), a laktid/glikolid aránytól függően átlagosan $d = 200$ - 225 nm nagyságú hidrodinamikai átmérő érhető el. A PLA/PLGA makromolekulák hidrofil jellegének növelésével a TP kapszulázási hatékonysága tovább növelhető. A kolloid részecskék hatóanyag tartalmát vizsgálva megállapítottuk, hogy a legnagyobb kapszulázási hatékonyság a PLGA65 esetében figyelhető meg (PLGA65: 88 %, PLGA75: 75%, PLA: 69 %).

PLGA alapú hordozó rendszereknél megvizsgáltuk, hogy a mag-héj struktúra előállítható-e egy mikroreaktorral (μ -mixer cella) ellátott folyamatos áramú berendezéssel. Igazoltuk, hogy megfelelő áramlási sebességek mellett TP nélküli és TP-tartalmú PLGA50 kolloid mérettartományú részecskék keletkeznek. A szintézis paramétereit optimalizálva megállapítottuk, hogy a nanoprecipitációs módszerhez képest (~ 160 nm) ezen eljárással kisebb hidrodinamikai átmérővel rendelkező mag-héj nanoszerkezetű részecskék állíthatók elő (~ 135 nm). Az eredmények rámutattak arra, hogy a két módszernél a kapszulázási

hatékonyság vonatkozásban hasonló értékek érhetőek el. ($\sim 67,1$ % (nanoprecipitációs módszer), $\sim 71,5\%$ (áramlásos módszer)).

Munkánk során megvizsgáltuk a TP-PLA/PLGA és TP-PLUR között kialakuló kölcsönhatásokat is. A különböző TP-tartalmú PLA részecskéken végzett FT-IR mérések alapján a PLA-TP között nem alakul ki számottevő kölcsönhatás, így a hatóanyag kioldódását egyéb szerkezeti hatások nem befolyásolják. Turbidimetriás módszerrel igazoltuk, hogy a PLUR jelenlétében a TP oldhatósága megnövelhető, melyet a hőmérséklet emelése és a PBS közeg alkalmazása tovább növel.

In vitro körülmények között meghatároztuk a TP-tartalmú PLA/PLGA rendszerek kioldódási görbéit. Az eredmények azt bizonyították, hogy a polimerek hidrofíl jellegének és a kapszulázott hatóanyag mennyiségének növelésével hatóanyag visszatartás is nő (PLA: 35,0 %; PLGA75: 28,3 %, PLGA65: 19,8 %, PLGA50_{nanoprecipitáció}: 8 %, PLGA50_{áramlásos technika}: 12 %). A kioldódási adatokra nemlineáris regresszióval illesztett kinetikai modellek közül, a determinációs együtthatót figyelembe véve, a legjobb illesztést a Weibull és a Korsmeyer-Peppas egyenletek adják ($R^2 \approx 0,99$). A sikeresen definiált kinetikai paraméterek igazolták a kioldódási folyamatok főként diffúzió kontrollált jellegét.

A PLA/PLGA alapú rendszerek tanulmányozását követően a hidrofíl tulajdonságú HyA térhálósításával és neutralizálásával (CTAB, Chit) állítottunk elő hatóanyag hordozó kolloid részecskéket. A részecskék előállítása mellett a HyA származékok szerkezeti változásait, összetételét és a kialakuló kölcsönhatásokat is jellemeztük. FT-IR és termoanalitikai mérésekkel igazoltuk, hogy 200-500 kDa átlagos molekulatömegű M-HyA diaminnal történő részleges (50-75 % cl-M-HyA) és teljes (100 % cl-M-HyA) térhálósítása sikeresen megtörtént. Dinamikus fényszórás mérésekkel és TEM felvételekkel igazoltuk, hogy a rendszerekben tisztán hialuronsav alapú kolloid részecskék képződnek, amelyek hidrodinamikai átmérője a keresztkötés mértékének növelésével $d \sim 45$ nm -ről (50 % cl-M-HyA) $d \sim 110$ nm -re (100 % cl-M-HyA) folyamatosan nő. A legnagyobb kolloid stabilitást a 100 %-ban keresztkötött származéknál állapítottuk meg ($\zeta \sim -23,6$ mV).

Kationos felületaktív anyag (CTAB) alkalmazásával is eredményesen állítottunk elő hialuronsav/tenzid komplex nanorészecskéket. Konduktometriás, izoterm titrációs mikrokalorimetriás, rotációs viszkozitás és ζ -potenciál mérésekkel kvantitatív módon jellemeztük a makromolekula és a felületaktív anyag kölcsönhatását. A vizsgálatokkal reprodukciósan igazoltuk, hogy a M-HyA monomer egységenkénti egy negatív töltése közel egy CTAB molekula révén kompenzálható. A teljes töltéskompenzálás eléréséig kis méretű kolloid részecskék képződése a preferált ($d \sim 50$ nm ($m_{CTAB}/m_{HyA} = 0,75$)), míg a

neutralizálás közelében a részecskék nagymértékű aggregációja figyelhető meg, mely már kedvezőtlen gyógyszerhordozó rendszerként történő felhasználáshoz.

A M-HyA és a módosított M-HyA viszkozitási (és ezzel szerkezeti) tulajdonságának meghatározásához különböző reológiai méréseket végeztünk. A vizsgálatok által igazoltuk, hogy a polimer oldatok, valamint a M-HyA hidrogélek a koncentráció növekedésével (0,05 mg/mL –től 100 mg/mL–ig) Newtoni-, pszeudoplasztikus, majd viszkoelasztikus viselkedést mutatnak. A hidrogélek esetében elvégzett oszcillációs mérések alapján megerősítettük, hogy a koncentráció növekedésével, 100 mg/mL M-HyA koncentrációt elérve, a gélek elasztikus viselkedése a domináns a viszkózus sajátsággal szemben. Megállapítottuk továbbá, hogy a keresztkötött hidrogéleknél a keresztkötés mértékének növekedésével, a koherens gél szerkezet felbomlása miatt, a viszkózus-, míg a kationos tenziddel neutralizált asszociációs kolloidok esetében a tenzid koncentráció növelésével az elasztikus sajátság válik meghatározóvá.

A keresztkötött és a M-HyA/CTAB szerkezeti vizsgálatai után az előállított nanorészecskéket eredményesen alkalmaztuk KP molekulák kapszulázására. A kioldódási görbék alapján igazoltuk, hogy mérhetően nagy hatóanyag visszatartás érhető el a M-HyA/CTAB nanorészecskék alkalmazása esetén. Az adatokra legjobban illeszkedő Korsmeyer-Peppas és a Weibull kinetikai modellek rámutattak, hogy a cl-M-HyA mintáknál minden esetben a főként diffúzió kontrollált hatóanyag kioldódás a domináns, míg a M-HyA/CTAB rendszerénél a CTAB mennyiségének növelésével a diffúzió kontrol mellett az eróziós folyamatok hatása egyre erősebbé válik.

Kvantitatív módon tanulmányoztuk a kitozán és a hialuronsav makromolekulák kölcsönhatását. Az áramlási potenciál és látszólagos viszkozitási görbék alapján a monomeregységenként egy pozitív (Chit) és egy negatív töltéssel (H-HyA) rendelkező makromolekulák közötti elektrosztatikus kölcsönhatás mértékét, ezáltal a várt 1:1 monomer mólarány szerinti teljes töltéskompenzálást, a közeg pH-ja és a Chit deacetilezési foka erősen befolyásolja. A FT-IR és termoanalitikai (TG, DTG, DSC) vizsgálatokkal, megállapítottuk, hogy a M-Chit-H-HyA komplexek összetétele a poliszacharidok tömegarányával nem változik. Különböző technikákkal sikeresen állítottunk elő eltérő szerkezeti felépítésű elektrosztatikusan kompenzált Chit/HyA, tripolifoszfáttal (TPP) keresztkötött Chit-TPP/HyA és mag-héj szerkezetű Chit-TPP_{mag}/HyA_{héj} kolloid részecskéket. A DLS eredmények alapján megállapítottuk, hogy a kisméretű részecskék képződése ($d = 100\text{--}300\text{ nm}$), a fenn felsorolt részecskék típusától függetlenül, jelentősebb Chit ($m_{\text{Chit}}/m_{\text{HyA}} = 20\text{--}80$) vagy HyA ($m_{\text{Chit}}/m_{\text{HyA}} = 0,125\text{--}0,500$) makromolekula túlsúly esetén a kedvezményezett.

7. Summary

Due to the wide applicability of the (bio) polymer-based nanostructured drug delivery systems, in the last few decades they have an increasing role in the pharmaceutical and nanomedicine research fields as well. By varying the experimental parameters and preparation techniques that control the formation of these carriers, we can produce an optimized system for each drug derivative, as a result of thereby, both the release and the efficacy can be controlled.

In recent years, the preparation of mostly protein-based drug carrier colloid particles has a special role in our research group, where the main goal is the successful penetration of neuroactive molecules across the blood-brain barrier. Continuing this research, I started my work in the autumn of 2017, within the framework of a newly won GINOP-2.3.2 tender. My main task was to design and optimize new type of mainly polymer- and polysaccharide-based drug delivery systems via development of reproducible syntheses. We successfully developed macromolecular (PLA, PLGA, HyA, Chit) colloids-based, nanostructured carrier systems, where we studied the properties of these carrier systems (such as hydrophilicity, structure and surface charge) on the encapsulation efficiency of small molecules having different hydrophilicities, structures and charges. We determined that, what experimental factors influence the size, structure, and morphology of the formed particles. As it was possible, we studied the kinetics of drug release as well.

As the first step of my doctoral work, I successfully prepared PLA polymer and PLGA copolymers with different lactide / glycolide ratios by ring-opening polymerization process, which can be used as drug carriers confirmed by DSC and FT-IR spectroscopic measurements. Based on the light scattering experiments and the precipitation titration curves we confirmed that the synthesized PLA / PLGA polymers show a low molecular weight and narrow distribution. The wetting properties, which characterized by contact angle measurements, were in good agreement with the contact angle values of the same commercially available polymers. Furthermore, we confirmed that the hydrophilicity of the copolymers is systematically increased with increasing glycolide content (PLA: $74.55 \pm 0.82^\circ$, PLGA75: $70.50 \pm 0.25^\circ$, PLGA65 $68.18 \pm 0.61^\circ$).

In the next step, we prepared colloidal-sized particles from our synthesized PLA/PLGA macromolecules by nanoprecipitation method. Based on the experiments, the hydrodynamic diameter, structure and stability of the particles can be controlled by the material quality (boiling point, difference between the densities) of the solvents (1,4-

dioxane, acetone) and the chemical structure (molecular weight, charge) of the stabilizer molecules (PLUR, PVA, CTAB) as well. The DLS measurements and the recorded TEM images confirmed that the application of the acetone as organic phase, with lower density and boiling point than 1,4-dioxane, results in 10-70 nm smaller particles. For studying of the stabilizer molecules, we determined that the largest hydrodynamic diameter and ζ -potential values were obtained for positively charged CTAB (e.g. ~ 261 nm, $\zeta_{\text{washed}} \approx -53$ mV (PLGA75)), while the smallest was achieved using PLUR (e.g., ~ 180 nm, $\zeta_{\text{washed}} \approx -88$ mV (PLGA75)). Based on these results, it can be stated that the size of the drug carrier particles can be further reduced with the appropriate selection of the stabilizer. For the determination of the encapsulation capability of the PLA/PLGA macromolecular colloids, we stated that, in case of the different hydrophilicity compounds (TPGS > KP > TP), the formation of the core-shell structured drug carrier systems is become possible by the decreasing of the hydrophilicity of the molecules. This structure was determined for the TP with the most hydrophobic property.

For the TP -loaded PLA nanoparticles having core-shell structure, we determined that the ratios of the carrier, the drug and the stabilizer concentration greatly influence the formation of the structure and the encapsulation efficiency. The TEM images showed that the formation of the core-shell structure is become unfavourable by decreasing of the component concentrations. Beside the particle size and structure- optimized concentration parameters ($c_{\text{PLA/PLGA}} = 10$ mg/mL és $c_{\text{TP}} = 2.5$ mg/mL (1 mL acetone phase), $c_{\text{PLUR}} = 0.1$ mg/mL (10 mL water phase), depending of the lactide/glycolide ratio, the average hydrodynamic diameter of $d = 200\text{--}225$ nm can be achieved. As the hydrophilicity of the PLA/PLGA increases, the encapsulation efficiency of the TP can be increased. When examining the drug content of the colloidal particles, it was found that the highest encapsulation efficiency was observed for PLGA65 (PLGA65: 88 %, PLGA75: 75%, PLA: 69 %).

In case of PLGA-based delivery systems, we investigated whether this core-shell structure can be prepared with a microreactor (μ -mixer cell) -equipped continuous flow apparatus. We confirmed that the TP-free and TP-loaded PLGA50 colloidal particles are formed at appropriate flow rates. By optimizing of the synthesis parameters, we determined that core-shell nanostructured particles with smaller hydrodynamic diameter can be produced by this method (~ 135 nm) compared to the nanoprecipitation method (~ 160 nm). The results pointed out that, similar values for the encapsulation efficiency could be obtained for the two methods: (~ 67.1 % (nanoprecipitation), ~ 71.5 % (flow method)).

In our work, we examined the interactions between TP – PLA/PLGA and TP – PLUR too. Based on the FT-IR measurements of the different TP -loaded PLA, the measurable interaction between PLA-TP cannot be observed thus the dissolution of the drug cannot be influenced by structural alterations. By turbidimetry, we demonstrated that the solubility of TP can be increased in the presence of PLUR, which is further enhanced by the increase of the temperature and the application of PBS medium.

We determined the release curves of the TP-loaded PLA/PLGA systems in *in vitro* conditions. The results showed that the drug retention was increased with the increasing hydrophilicity of the polymers and the amount of the encapsulated drug (PLA: 35.0 %; PLGA75: 28.3 %, PLGA65: 19.8 %, PLGA50_{nanoprecipitation}: 8.0 %, PLGA50_{flow technique}: 12.0 %). Among the kinetic models, which we fitted to the dissolution data by nonlinear regression, taking into the coefficient of determination account, the best fit is given by the Weibull and Korsmeyer-Peppas equations ($R_2 \approx 0.99$). The successfully defined kinetic parameters confirm the mainly diffusion-controlled nature of the dissolution processes.

After studying PLA/PLGA -based systems, the drug carrier colloidal particles were prepared by cross-linking and neutralization (CTAB, Chit) of hydrophilic HyA. In addition to the preparation of the particles, we characterized the structural changes, the composition, and the evolving interaction of the HyA derivatives. FT-IR and thermoanalytical measurements confirmed that the partial (50-75 % cl-M-HyA) and complete (100 % cl-M-HyA) cross-linking of the 200-500 kDa average molecular weight HyA with diamine was successful. Based on the dynamic light scattering measurements and the TEM images, pure hyaluronic acid -based colloidal particles were formed in the system, the hydrodynamic diameter continuously increases from $d \sim 45$ nm (50 % cl-M-HyA) to $d \sim 110$ nm (100 % cl-M-HyA) by increasing the degree of the cross-linking. The highest colloidal stability was found for the 100 % cross-linked derivative ($\zeta \sim -23.6$ mV).

Hyaluronic acid / surfactant complex nanoparticles were also successfully prepared by cationic surfactant (CTAB). Conductivity, isothermal titration microcalorimetry, rotational viscosity and ζ -potential measurements quantitatively characterized the interaction between the macromolecule and the surfactant. By the measurements, we reproducibly verified that one negative charge of M-HyA monomer unit can be compensated by nearly one CTAB molecule. Until the full charge compensation, the formation of the small colloidal particles is preferred ($d \sim 50$ nm ($m_{CTAB}/m_{HyA} = 0,75$)), while near the neutralization the large aggregation of the particles is observed, which is already unfavourable for using as drug delivery system.

To determine the viscosity (and thus structural) property of the M-HyA and modified M-HyA, various rheological measurements were performed. The studies have confirmed, the polymer solutions and the hydrogels show Newtonian, pseudoplastic then viscoelastic behaviour with increasing of the concentration (from 0.05 mg/mL to 100 mg/mL). Based on the oscillation measurements of the hydrogels, we showed that the increasing of the concentration, reaching of the 100 mg/mL M-HyA concentration, the elastic behaviour of the gels is dominant as against of the viscous property. It was further found, at the cross-linked hydrogels by the increasing of the cross-link degree, due to the disintegration of the coherent gel structure, the viscous-, while in case of the increasing surfactant concentration at the cationic surfactant (CTAB) neutralized association colloids, the elastic property is become dominant.

After the structural studies of the cross-linked M-HyA and the neutralized M-HyA/CTAB, the nanoparticles were successfully used to encapsulate KP molecules. We determined by the dissolution curves, that measurably high drug retention could be achieved with M-HyA / CTAB nanoparticles. The Korsmeyer-Peppas and Weibull kinetic models, which were shown best fitted to the data, were pointed out, the diffusion-controlled drug release is dominant for all cases of cl-M-HyA samples, while increasing of the CTAB amount in the M-HyA / CTAB system, on addition to diffusion control, the effect of erosion processes is become stronger.

The interaction of chitosan and hyaluronic acid macromolecules was studied quantitatively. We confirmed, the degree of the electrostatic interaction between the one positive (Chit) and one negative charge (H-HyA) monomer units-contained macromolecules, thereby the expected total charge compensation at the 1: 1 monomer molar ratio, is strongly influenced by the pH of the medium and the degree of the deacetylation of Chit. By the FT-IR and the termoanalytical experiments, we determined that the composition of the Chit-HyA complexes does not change significantly with the weight ratio of the polysaccharides.

By different production protocols, we successfully prepared electrostatically compensated Chit / HyA, tripolyphosphate (TPP) cross-linked Chit-TPP / HyA, and core-shell structure Chit-TTP_{core} / HyA_{shell} colloidal particles with different structural features. Based on the DLS results, we found that the formation of small particles ($d = 100\text{-}300\text{ nm}$), regardless of the type of the above listed particles, is beneficiary in case of the significant Chit ($m_{\text{Chit}}/m_{\text{HyA}} = 20\text{-}80$) or HyA ($m_{\text{Chit}} / m_{\text{HyA}} = 0.125\text{-}0.500$) macromolecule predominance.

8. Irodalomjegyzék

1. Mishra, B.; Patel, B.B.; Tiwari, S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2010**, *6*, 9–24.
2. Storm, G.; Belliot, S.O.; Daemen, T.; Lasic, D.D. Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, *17*, 31–48.
3. Manaia, E.B.; Abuçafy, M.P.; Chiari-Andréo, B.G.; Silva, B.L.; Oshiro Junior, J.A.; Chiavacci, L.A. Physicochemical characterization of drug nanocarriers. *Int. J. Nanomedicine* **2017**, *12*, 4991–5011.
4. Barenholz, Y. Doxil® - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J. Control. Release* **2012**, *160*, 117–134.
5. Miele, E.; Spinelli, G.P.; Miele, E.; Tomao, F.; Tomao, S. Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer. *Int. J. Nanomedicine* **2009**, *4*, 99–105.
6. Lee, K.S.; Chung, H.C.; Im, S.A.; Park, Y.H.; Kim, C.S.; Kim, S.B.; Rha, S.Y.; Lee, M.Y.; Ro, J. Multicenter phase II trial of Genexol-PM, a Cremophor-free, polymeric micelle formulation of paclitaxel, in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2008**, *108*, 241–250.
7. Van Der Meel, R.; Oliveira, S.; Altintas, I.; Haselberg, R.; Van Der Veeke, J.; Roovers, R.C.; Van Bergen En Henegouwen, P.M.P.; Storm, G.; Hennink, W.E.; Schiffelers, R.M.; et al. Tumor-targeted Nanobullets: Anti-EGFR nanobody-liposomes loaded with anti-IGF-1R kinase inhibitor for cancer treatment. *J. Control. Release* **2012**, *159*, 281–289.
8. Chen, Y.; Zhang, F.; Wang, Q.; Tong, R.; Lin, H.; Qu, F. Near-infrared light-mediated LA-UCNPs@SiO₂-C/HA@mSiO₂-DOX@NB nanocomposite for chemotherapy/PDT/PTT and imaging. *Dalt. Trans.* **2017**, *46*, 14293–14300.
9. Li, Z.; Tan, S.; Li, S.; Shen, Q.; Wang, K. Cancer drug delivery in the nano era: An overview and perspectives (Review). *Oncol. Rep.* **2017**, *38*, 611–624.
10. Ajnai, G.; Chiu, A.; Kan, T.; Cheng, C.C.; Tsai, T.H.; Chang, J. Trends of Gold Nanoparticle-based Drug Delivery System in Cancer Therapy. *J. Exp. Clin. Med.* **2014**, *6*, 172–178.
11. Tsuchida, K.; Murakami, T. Recent Advances in Inorganic Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems. *Mini-Reviews Med. Chem.* **2008**, *8*, 175–183.
12. Arruebo, M.; Fernández-Pacheco, R.; Ibarra, M.R.; Santamaría, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today* **2007**, *2*, 22–32.
13. Tang, F.; Li, L.; Chen, D. Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, biocompatibility and drug delivery. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 1504–1534.
14. Rives, V.; Del Arco, M.; Martín, C. Layered double hydroxides as drug carriers and for controlled release of non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs): A review. *J. Control. Release* **2013**, *169*, 28–39.
15. Lohse, S.E.; Murphy, C.J. Applications of colloidal inorganic nanoparticles: From medicine to energy. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15607–15620.
16. Varga, N.; Benkő, M.; Sebők, D.; Bohus, G.; Janovák, L.; Dékány, I. Mesoporous silica core-shell composite functionalized with polyelectrolytes for drug delivery. *Microporous Mesoporous Mater.* **2015**, *213*, 134–141.

17. Deák, Á.; Csapó, E.; Juhász, Á.; Dékány, I.; Janovák, L. Anti-ulcerant kynurenic acid molecules intercalated Mg/Al-layered double hydroxide and its release study. *Appl. Clay Sci.* **2018**, *156*, 28–35.
18. Allen, T.M.; Cullis, P.R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 36–48.
19. Karim, K.; Mandal, A.; Biswas, N.; Guha, A.; Chatterjee, S.; Behera, M.; Kuotsu, K. Niosome: A future of targeted drug delivery systems. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* **2010**, *1*, 374–380.
20. Singh, U.; Dar, M.M.; Hashmi, A.A. Dendrimers: Synthetic strategies, properties and applications. *Orient. J. Chem.* **2014**, *30*, 911–922.
21. Gillies, E.R.; Fréchet, J.M.J. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 35–43.
22. Elzoghby, A.O.; Samy, W.M.; Elgindy, N.A. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *J. Control. Release* **2012**, *157*, 168–182.
23. Varga, N.; Csapó, E.; Majláth, Z.; Ilisz, I.; Krizbai, I.A.; Wilhelm, I.; Knapp, L.; Toldi, J.; Vécsei, L.; Dékány, I. Targeting of the kynurenic acid across the blood-brain barrier by core-shell nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, *86*, 67–74.
24. Kovács, A.N.; Varga, N.; Gombár, G.; Hornok, V.; Csapó, E. Novel feasibilities for preparation of serum albumin-based core-shell nanoparticles in flow conditions. *J. Flow Chem.* **2020**, *10*, 497–505.
25. Kovács, A.N.; Varga, N.; Juhász, Á.; Csapó, E. Serum protein-hyaluronic acid complex nanocarriers: Structural characterisation and encapsulation possibilities. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *251*, 117047.
26. Mora-Huertas, C.E.; Fessi, H.; Elaissari, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.* **2010**, *385*, 113–142.
27. Lee, J.H.; Yeo, Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. *Chem. Eng. Sci.* **2015**, *125*, 75–84.
28. Destribats, M.; Eyharts, M.; Lapeyre, V.; Sellier, E.; Varga, I.; Ravaine, V.; Schmitt, V. Impact of pNIPAM microgel size on its ability to stabilize pickering emulsions. *Langmuir* **2014**, *30*, 1768–1777.
29. Chamundeeswari, M.; Jeslin, J.; Verma, M.L. Nanocarriers for drug delivery applications. *Environ. Chem. Lett.* **2019**, *17*, 849–865.
30. Pridgen, E.M.; Langer, R.; Farokhzad, O.C. Biodegradable, polymeric nanoparticle delivery systems for cancer therapy. *Nanomedicine* **2007**, *2*, 669–680.
31. Pawar, D.; Mangal, S.; Goswami, R.; Jaganathan, K.S. Development and characterization of surface modified PLGA nanoparticles for nasal vaccine delivery: Effect of mucoadhesive coating on antigen uptake and immune adjuvant activity. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *85*, 550–559.
32. de Britto, D.; de Moura, M.R.; Aouada, F.A.; Mattoso, L.H.C.; Assis, O.B.G. N,N,N-trimethyl chitosan nanoparticles as a vitamin carrier system. *Food Hydrocoll.* **2012**, *27*, 487–493.
33. Mittal, G.; Sahana, D.K.; Bhardwaj, V.; Ravi Kumar, M.N.V. Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo. *J. Control. Release* **2007**, *119*, 77–85.

34. Mitra, S.; Gaur, U.; Ghosh, P.C.; Maitra, A.N. Tumour targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. In Proceedings of the Journal of Controlled Release; Elsevier, **2001**; 74, 317–323.
35. Yoo, H.S.; Lee, K.H.; Oh, J.E.; Park, T.G. In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates. *J. Control. Release* **2000**, 68, 419–431.
36. Wang, H.; Agarwal, P.; Zhao, S.; Xu, R.X.; Yu, J.; Lu, X.; He, X. Hyaluronic acid-decorated dual responsive nanoparticles of Pluronic F127, PLGA, and chitosan for targeted co-delivery of doxorubicin and irinotecan to eliminate cancer stem-like cells. *Biomaterials* **2015**, 72, 74–89.
37. Missirlis, D.; Kawamura, R.; Tirelli, N.; Hubbell, J.A. Doxorubicin encapsulation and diffusional release from stable, polymeric, hydrogel nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, 29, 120–129.
38. Joshi, M.D.; Patravale, V.; Prabhu, R. Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights. *Int. J. Nanomedicine* **2015**, 10, 1001–1018,
39. Nitta, S.; Numata, K. Biopolymer-Based Nanoparticles for Drug/Gene Delivery and Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, 14, 1629–1654,
40. Goldberg, M.; Langer, R.; Jia, X. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2007**, 18, 241–268.
41. Torchilin, V.P. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, 13, 813–827.
42. Sawant, R.M.; Hurley, J.P.; Salmaso, S.; Kale, A.; Tolcheva, E.; Levchenko, T.S.; Torchilin, V.P. “SMART” drug delivery systems: Double-targeted pH-responsive pharmaceutical nanocarriers. *Bioconjug. Chem.* **2006**, 17, 943–949.
43. Rao, J.P.; Geckeler, K.E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Prog. Polym. Sci.* **2011**, 36, 887–913.
44. Nicolas, J.; Mura, S.; Brambilla, D.; Mackiewicz, N.; Couvreur, P. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 1147–1235
45. Quintanar-Guerrero, D.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1998**, 24, 1113–1128
46. Vanderhoff, J.W., El Aasser. M.S., Ugelstad J., Polymer emulsification process. US Patent 4,177,177; **1979**
47. Deshmukh, R.; Wagh, P.; Naik, J. Solvent evaporation and spray drying technique for micro- and nanospheres/particles preparation: A review. *Dry. Technol.* **2016**, 34, 1758–1772.
48. G. Nava-Arzaluz, M.; Pinon-Segundo, E.; Ganem-Rondero, A.; Lechuga-Ballesteros, D. Single Emulsion-Solvent Evaporation Technique and Modifications for the Preparation of Pharmaceutical Polymeric Nanoparticles. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* **2012**, 6, 209–223.
49. Park, H.; Ha, D.-H.; Ha, E.-S.; Kim, J.-S.; Kim, M.-S.; Hwang, S.-J. Effect of Stabilizers on Encapsulation Efficiency and Release Behavior of Exenatide-Loaded PLGA Microsphere Prepared by the W/O/W Solvent Evaporation Method. *Pharmaceutics* **2019**, 11, 627.
50. Iqbal, M.; Zafar, N.; Fessi, H.; Elaissari, A. Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *Int. J. Pharm.* **2015**, 496, 173–190.

51. Mendoza-Munoz, N.; Quintanar-Guerrero, D.; Allemann, E. The Impact of the Salting-Out Technique on the Preparation of Colloidal Particulate Systems for Pharmaceutical Applications. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* **2012**, *6*, 236–249.
52. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.P.; Ammoury, N.; Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* **1989**, *55*, R1–R4.
53. Hornig, S.; Heinze, T.; Becer, C.R.; Schubert, U.S. Synthetic polymeric nanoparticles by nanoprecipitation. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 3838–3840.
54. Bilati, U.; Allémann, E.; Doelker, E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**, *24*, 67–75.
55. Poletto, F.S.; Fiel, L.A.; Donida, B.; Ré, M.I.; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R. Controlling the size of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanoparticles prepared by emulsification-diffusion technique using ethanol as surface agent. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2008**, *324*, 105–112.
56. Shakeri, F.; Shakeri, S.; Hojjatoleslami, M. Preparation and Characterization of Carvacrol Loaded Polyhydroxybutyrate Nanoparticles by Nanoprecipitation and Dialysis Methods. *J. Food Sci.* **2014**, *79*, N697–N705.
57. Zhang, Z.; Feng, S.S. In vitro investigation on poly(lactide)-tween 80 copolymer nanoparticles fabricated by dialysis method for chemotherapy. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 1139–1146.
58. Byrappa, K.; Ohara, S.; Adschiri, T. Nanoparticles synthesis using supercritical fluid technology - towards biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 299–327.
59. Liu, Z.; Jiao, Y.; Wang, Y.; Zhou, C.; Zhang, Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1650–1662.
60. Bodnár, M.; Daróczy, L.; Batta, G.; Bakó, J.; Hartmann, J.F.; Borbély, J. Preparation and characterization of cross-linked hyaluronan nanoparticles. *Colloid Polym. Sci.* **2009**, *287*, 991–1000.
61. Ma, J.; Lee, S.M.Y.; Yi, C.; Li, C.W. Controllable synthesis of functional nanoparticles by microfluidic platforms for biomedical applications-a review. *Lab Chip* **2017**, *17*, 209–226.
62. Shriml, P.; Jadeja, G.; Patel, S. A review on novel methodologies for drug nanoparticle preparation: Microfluidic approach. *Chem. Eng. Res. Des.* **2020**, *153*, 728–756.
63. Rezvantalab, S.; Keshavarz Moraveji, M. Microfluidic assisted synthesis of PLGA drug delivery systems. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 2055–2072.
64. Lee, C.-Y.; Chang, C.-L.; Wang, Y.-N.; Fu, L.-M. Microfluidic Mixing: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 3263–3287.
65. Karnik, R.; Gu, F.; Basto, P.; Cannizzaro, C.; Dean, L.; Kyei-Manu, W.; Langer, R.; Farokhzad, O.C. Microfluidic platform for controlled synthesis of polymeric nanoparticles. *Nano Lett.* **2008**, *8*, 2906–2912.
66. De Solorzano, I.O.; Uson, L.; Larrea, A.; Miana, M.; Sebastian, V.; Arruebo, M. Continuous synthesis of drug-loaded nanoparticles using microchannel emulsification and numerical modeling: Effect of passive mixing. *Int. J. Nanomedicine* **2016**, *11*, 3397–3416.
67. Auras, R. Poly(lactic acid), *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, **2010**, doi: 10.1002/0471440264.pst275

68. Avérous, L. Polylactic acid: Synthesis, properties and applications. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*; **2008**; 433–450
69. da Silva, D.; Kaduri, M.; Poley, M.; Adir, O.; Krinsky, N.; Shainsky-Roitman, J.; Schroeder, A. Biocompatibility, biodegradation and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and theranostic systems. *Chem. Eng. J.* **2018**, *340*, 9–14.
70. Carothers, W.H.; Borough, G.L.; Natta, F.J. Studies of polymerization and ring formation. X. The reversible polymerization of six-membered cyclic esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1932**, *54*, 761–772.
71. Laopaiboon, P.; Thani, A.; Leelavatcharamas, V.; Laopaiboon, L. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 1036–1043.
72. Adsul, M.G.; Varma, A.J.; Gokhale, D. V. Lactic acid production from waste sugarcane bagasse derived cellulose. *Green Chem.* **2007**, *9*, 58–62.
73. Castillo Martinez, F.A.; Balciunas, E.M.; Salgado, J.M.; Domínguez González, J.M.; Converti, A.; Oliveira, R.P. de S. Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2013**, *30*, 70–83.
74. Lasprilla, A.J.R.; Martinez, G.A.R.; Lunelli, B.H.; Jardini, A.L.; Filho, R.M. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - A review. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 321–328.
75. Pyda, M.; Bopp, R.C.; Wunderlich, B. Heat capacity of poly(lactic acid). *J. Chem. Thermodyn.* **2004**, *36*, 731–742.
76. Lim, L.T.; Auras, R.; Rubino, M. Processing technologies for poly(lactic acid). *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33*, 820–852.
77. Houchin, M.L.; Topp, E.M. Chemical degradation of peptides and proteins in PLGA: A review of reactions and mechanisms. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 2395–2404.
78. Chen, G.X.; Kim, H.S.; Kim, E.S.; Yoon, J.S. Synthesis of high-molecular-weight poly(l-lactic acid) through the direct condensation polymerization of l-lactic acid in bulk state. *Eur. Polym. J.* **2006**, *42*, 468–472.
79. Gu, S.; Yang, M.; Yu, T.; Ren, T.; Ren, J. Synthesis and characterization of biodegradable lactic acid-based polymers by chain extension. *Polym. Int.* **2008**, *57*, 982–986.
80. Mehta, R.; Kumar, V.; Bhunia, H.; Upadhyay, S.N. Synthesis of poly(lactic acid): A review. *J. Macromol. Sci. - Polym. Rev.* **2005**, *45*, 325–349.
81. D’Avila Carvalho Erbeta, C. Synthesis and Characterization of Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Copolymer. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* **2012**, *03*, 208–225.
82. Silva, A.T.C.R.; Cardoso, B.C.O.; Silva, M.E.S.R. e; Freitas, R.F.S.; Sousa, R.G. Synthesis, Characterization, and Study of PLGA Copolymer *in Vitro* Degradation. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* **2015**, *06*, 8–19.
83. Danhier, F.; Ansorena, E.; Silva, J.M.; Coco, R.; Le Breton, A.; Préat, V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *J. Control. Release* **2012**, *161*, 505–522.
84. Astete, C.E.; Sabliov, C.M. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2006**, *17*, 247–289.
85. Kiss, É.; Gyulai, G.; Péntzes, C.B.; Idei, M.; Horváti, K.; Bacsá, B.; Bosze, S. Tuneable surface modification of PLGA nanoparticles carrying new antitubercular drug candidate. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2014**, *458*, 178–186.

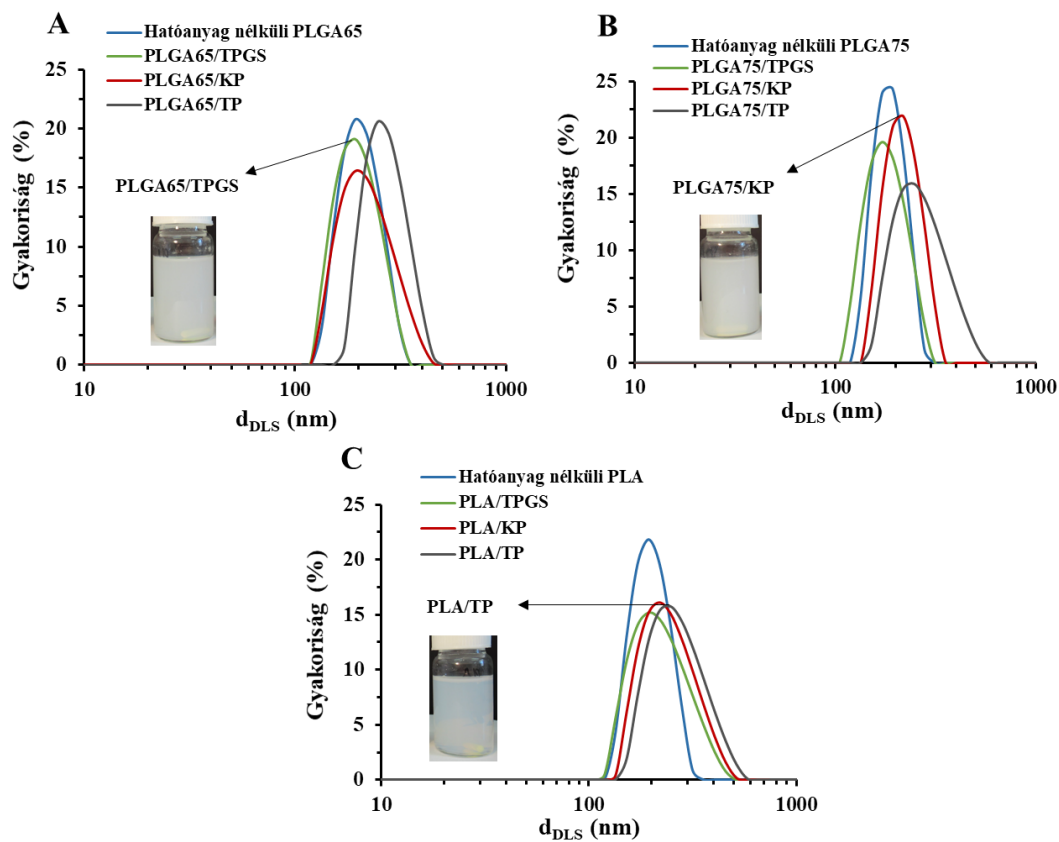
86. Gyulai, G.; Magyar, A.; Rohonczy, J.; Orosz, J.; Yamasaki, M.; Bősze, S.; Kiss Preparation and characterization of cationic pluronic for surface modification and functionalization of polymeric drug delivery nanoparticles. *Express Polym. Lett.* **2016**, *10*, 216–226.
87. Huang, W.; Zhang, C. Tuning the Size of Poly(lactic-co-glycolic Acid) (PLGA) Nanoparticles Fabricated by Nanoprecipitation. *Biotechnol. J.* **2018**, *13*, 1700203.
88. Lancheros, R.; Guerrero, C.A.; Godoy-Silva, R.D. Improvement of N-Acetylcysteine Loaded in PLGA Nanoparticles by Nanoprecipitation Method. *J. Nanotechnol.* **2018**, *2018*, doi: 10.1155/2018/3620373
89. Barichello, J.M.; Morishita, M.; Takayama, K.; Nagai, T. Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1999**, *25*, 471–476.
90. Sze, J.H.; Brownlie, J.C.; Love, C.A. Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review. *3 Biotech* **2016**, *6*, 1–9.
91. Necas, J.; Bartosikova, L.; Brauner, P.; Kolar, J. Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. *Vet. Med. (Praha)*. **2008**, *53*, 397–411.
92. Huang, G.; Huang, H. Hyaluronic acid-based biopharmaceutical delivery and tumor-targeted drug delivery system. *J. Control. Release* **2018**, *278*, 122–126.
93. Dicker, K.T.; Gurski, L.A.; Pradhan-Bhatt, S.; Witt, R.L.; Farach-Carson, M.C.; Jia, X. Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 1558–1570.
94. Salwowska, N.M.; Bebenek, K.A.; Żądło, D.A.; Wcisło-Dziadecka, D.L. Physiochemical properties and application of hyaluronic acid: a systematic review. *J. Cosmet. Dermatol.* **2016**, *15*, 520–526.
95. Athamneh, T.; Amin, A.; Benke, E.; Ambrus, R.; Leopold, C.S.; Gurikov, P.; Smirnova, I. Alginate and hybrid alginate-hyaluronic acid aerogel microspheres as potential carrier for pulmonary drug delivery. *J. Supercrit. Fluids* **2019**, *150*, 49–55.
96. Falcone, S.J.; Berg, R.A. Crosslinked hyaluronic acid dermal fillers: A comparison of rheological properties. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2008**, *87A*, 264–271.
97. Venerová, T.; Pekař, M. Rheological properties of gels formed by physical interactions between hyaluronan and cationic surfactants. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *170*, 176–181.
98. Dodero, A.; Williams, R.; Gagliardi, S.; Vicini, S.; Alloisio, M.; Castellano, M. A micro-rheological and rheological study of biopolymers solutions: Hyaluronic acid. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *203*, 349–355.
99. Luo, Z.; Dai, Y.; Gao, H. Development and application of hyaluronic acid in tumor targeting drug delivery. *Acta Pharm. Sin. B* **2019**, *9*, 1099–1112.
100. Zhang, J.; Senger, B.; Vautier, D.; Picart, C.; Schaaf, P.; Voegel, J.C.; Lavalie, P. Natural polyelectrolyte films based on layer-by layer deposition of collagen and hyaluronic acid. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3353–3361.
101. Tian, H.; He, Z.; Sun, C.; Yang, C.; Zhao, P.; Liu, L.; Leong, K.W.; Mao, H.-Q.; Liu, Z.; Chen, Y. Uniform Core-Shell Nanoparticles with Thiolated Hyaluronic Acid Coating to Enhance Oral Delivery of Insulin. *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, *7*, 1800285.
102. Luo, Y.; Kirker, K.R.; Prestwich, G.D. Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: New biomaterials for drug delivery. *J. Control. Release* **2000**, *69*, 169–184.

103. Pitarresi, G.; Craparo, E.F.; Palumbo, F.S.; Carlisi, B.; Giammona, G. Composite nanoparticles based on hyaluronic acid chemically cross-linked with α,β -polyaspartylhydrazide. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1890–1898.
104. Maroda, M.; Bodnár, M.; Berkó, S.; Bakó, J.; Eřs, G.; Csányi, E.; Szabó-Révész, P.; Hartmann, J.F.; Kemény, L.; Borbély, J. Preparation and investigation of a cross-linked hyaluronan nanoparticles system. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83*, 1322–1329.
105. Berkó, S.; Maroda, M.; Bodnár, M.; Eros, G.; Hartmann, P.; Szentner, K.; Szabó-Révész, P.; Kemény, L.; Borbély, J.; Csányi, E. Advantages of cross-linked versus linear hyaluronic acid for semisolid skin delivery systems. *Eur. Polym. J.* **2013**, *49*, 2511–2517.
106. Tiwari, S.; Bahadur, P. Modified hyaluronic acid based materials for biomedical applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *121*, 556–571.
107. Miranda, D.G.; Malmonge, S.M.; Campos, D.M.; Attik, N.G.; Grosogeat, B.; Gritsch, K. A chitosan-hyaluronic acid hydrogel scaffold for periodontal tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2016**, *104*, 1691–1702.
108. Bendix, D. Chemical synthesis of polylactide and its copolymers for medical applications. *Polym. Degrad. Stab.* **1998**, *59*, 129–135.
109. Juhász, Á.; Tabajdi, R.; Dékány, I.; Csapó, E. Thermodynamic Characterization of Temperature- and Composition-Dependent Mixed Micelle Formation in Aqueous Medium. *J. Surfactants Deterg.* **2017**, *20*, 1291–1299.
110. Peppas, N.A.; Sahlin, J.J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *Int. J. Pharm.* **1989**, *57*, 169–172.
111. Costa, P.; Sousa Lobo, J.M. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *13*, 123–133.
112. Dash, S.; Murthy, P.N.; Nath, L.; Chowdhury, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* **2010**, *67*, 217–223.
113. Reich, G. Use of DSC to study the degradation behavior of PLA and PLGA microparticles. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1997**, *23*, 1177–1189.
114. Jamshidian, M.; Tehrany, E.A.; Imran, M.; Jacquot, M.; Desobry, S. Poly-Lactic Acid: Production, applications, nanocomposites, and release studies. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2010**, *9*, 552–571.
115. Duhem, N.; Danhier, F.; Préat, V. Vitamin E-based nanomedicines for anti-cancer drug delivery. *J. Control. Release* **2014**, *182*, 33–44.
116. Zigoneanu, I.G.; Astete, C.E.; Sabliov, C.M. Nanoparticles with entrapped α -tocopherol: Synthesis, characterization, and controlled release. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 105606.
117. Deák, Á.; Sebők, D.; Csapó, E.; Bérczi, A.; Dékány, I.; Zimányi, L.; Janovák, L. Evaluation of pH- responsive poly(styrene-co-maleic acid) copolymer nanoparticles for the encapsulation and pH- dependent release of ketoprofen and tocopherol model drugs. *Eur. Polym. J.* **2019**, *114*, 361–368.
118. Yokogawa, K.; Shima, Y.; Hashimoto, T.; Hiyajyo, M.; Kadoyama, K.; Ishizaki, J.; Nomura, M.; Miyamoto, K.I. High Bioavailability of α -Tocopherol Loaded into Poly (DL-Lactic-co-Glycolic Acid) Microspheres in Apolipoprotein B Knockout Mice. *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 1846–1850.
119. Mannila, A.; Kokki, H.; Heikkinen, M.; Laisalmi, M.; Lehtonen, M.; Louhisto, H.L.; Järvinen, T.; Savolainen, J. Cerebrospinal fluid distribution of ketoprofen after intravenous administration in young children. *Clin. Pharmacokinet.* **2006**, *45*, 737–743.

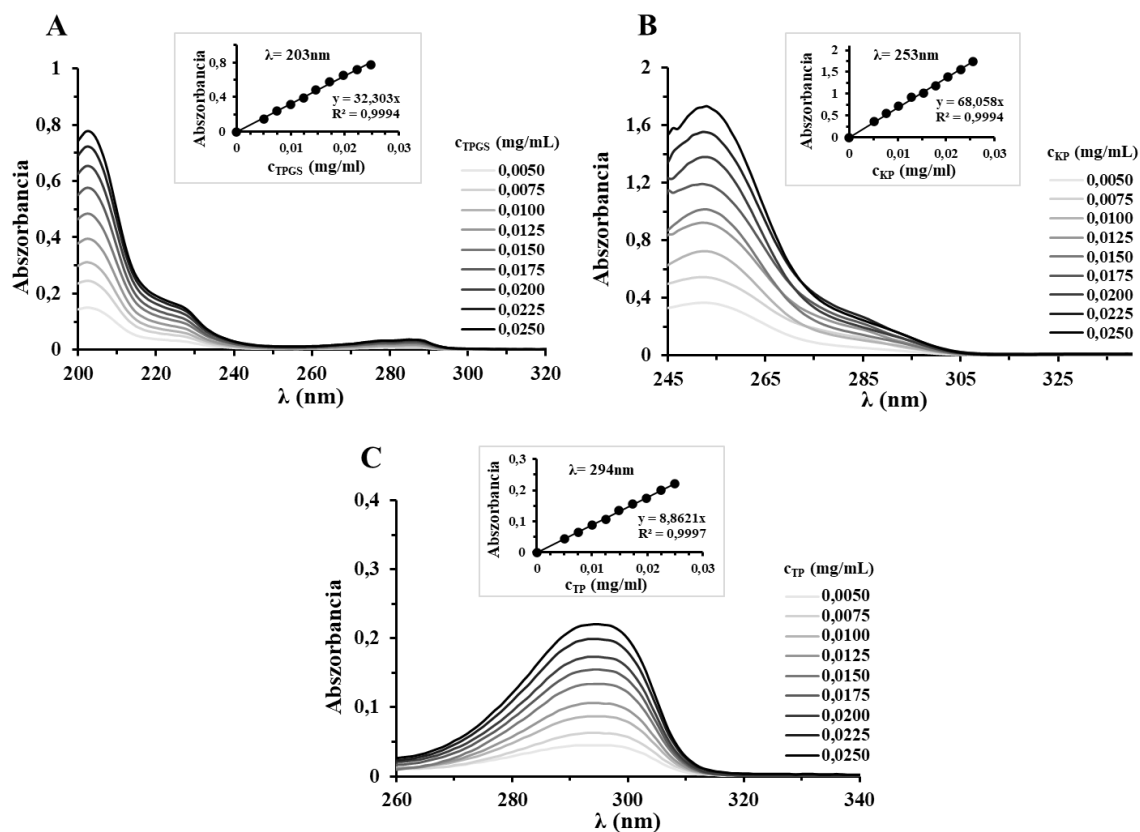
120. Niki, E.; Abe, K. CHAPTER 1: Vitamin E: Structure, Properties and Functions. In *Food Chemistry, Function and Analysis*; Royal Society of Chemistry, **2019**; 2019-January,. 1–11
121. Simon, L.C.; Stout, R.W.; Sabliov, C. Bioavailability of Orally Delivered Alpha-Tocopherol by Poly(Lactic-Co-Glycolic) Acid (PLGA) Nanoparticles and Chitosan Covered PLGA Nanoparticles in F344 Rats. *Nanobiomedicine* **2016**, 3, 8.
122. Murugesu, A.; Astete, C.; Leonardi, C.; Morgan, T.; Sabliov, C.M. Chitosan/PLGA particles for controlled release of α -tocopherol in the GI tract via oral administration. *Nanomedicine* **2011**, 6, 1513–1528.
123. Alqahtani, S.; Simon, L.; Astete, C.E.; Alayoubi, A.; Sylvester, P.W.; Nazzal, S.; Shen, Y.; Xu, Z.; Kaddoumi, A.; Sabliov, C.M. Cellular uptake, antioxidant and antiproliferative activity of entrapped α -tocopherol and γ -tocotrienol in poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) and chitosan covered PLGA nanoparticles (PLGA-Chi). *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, 445, 243–251.
124. Byun, Y.; Hwang, J.B.; Bang, S.H.; Darby, D.; Cooksey, K.; Dawson, P.L.; Park, H.J.; Whiteside, S. Formulation and characterization of α -tocopherol loaded poly ϵ -caprolactone (PCL) nanoparticles. *LWT - Food Sci. Technol.* **2011**, 44, 24–28.
125. Quintero, C.; Vera, R.; Perez, L.D. α -Tocopherol loaded thermosensitive polymer nanoparticles: Preparation, in vitro release and antioxidant properties. *Polimeros* **2016**, 26, 304–312.
126. Che Man, Y.B.; Ammawath, W.; Mirghani, M.E.S. Determining α -tocopherol in refined bleached and deodorized palm olein by Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chem.* **2005**, 90, 323–327.
127. Seedher, N.; Kanojia, M. Micellar solubilization of some poorly soluble antidiabetic drugs: A technical note. *AAPS PharmSciTech* **2008**, 9, 431–436.
128. Butt, A.M.; Amin, M.C.I.M.; Katas, H.; Sarisuta, N.; Witoonsaridsilp, W.; Benjakul, R. In vitro characterization of pluronic F127 and D- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate mixed micelles as nanocarriers for targeted anticancer-drug delivery. *J. Nanomater.* **2012**, 2012.
129. Lopes, J.R.; Loh, W. Investigation of self-assembly and micelle polarity for a wide range of ethylene oxide-propylene oxide-ethylene oxide block copolymers in water. *Langmuir* **1998**, 14, 750–756.
130. Bouchemal, K.; Agnely, F.; Koffi, A.; Ponchel, G. A concise analysis of the effect of temperature and propanediol-1, 2 on Pluronic F127 micellization using isothermal titration microcalorimetry. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, 338, 169–176.
131. Ritger, P.L.; Peppas, N.A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J. Control. Release* **1987**, 5, 23–36.
132. Alkrad, J.A.; Mrestani, Y.; Stroehl, D.; Wartewig, S.; Neubert, R. Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV-Vis spectroscopies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, 31, 545–550.
133. Servaty, R.; Schiller, J.; Binder, H.; Arnold, K. Hydration of polymeric components of cartilage - An infrared spectroscopic study on hyaluronic acid and chondroitin sulfate. *Int. J. Biol. Macromol.* **2001**, 28, 121–127.
134. Barbucci, R.; Consumi, M.; Magnani, A. Dependence of water uptake and morphology of hyaluronan- and alginate-based hydrogels on pH and degree of crosslinking. *Macromol. Chem. Phys.* **2002**, 203, 1292–1300.

135. Tomihata, K.; Ikada, Y. Crosslinking of hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide. *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, *37*, 243–251.
136. Barbucci, R.; Rappuoli, R.; Borzacchiello, A.; Ambrosio, L. Synthesis, chemical and rheological characterization of new hyaluronic acid-based hydrogels. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2000**, *11*, 383–399.
137. Li, N.; Liu, S.; Luo, H. A new method for the determination of the first and second CMC in CTAB solution by resonance Rayleigh scattering technology. *Anal. Lett.* **2002**, *35*, 1229–1238.
138. Modaressi, A.; Sifaoui, H.; Grzesiak, B.; Solimando, R.; Domanska, U.; Rogalski, M. CTAB aggregation in aqueous solutions of ammonium based ionic liquids; conductimetric studies. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2007**, *296*, 104–108.
139. Kargerová, A.; Pekař, M. High-Resolution Ultrasonic Spectroscopy Study of Interactions between Hyaluronan and Cationic Surfactants. *Langmuir* **2014**, *30*, 11866–11872.
140. Krouská, J.; Pekař, M.; Klučáková, M.; Šarac, B.; Bešter-Rogač, M. Study of interactions between hyaluronan and cationic surfactants by means of calorimetry, turbidimetry, potentiometry and conductometry. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *157*, 1837–1843.
141. Krutišová, T.; Hejná, J.; Pekař, M. Nanoparticles Formed By Self-Assembly Of Negatively Charged Hyaluronan And Cationic Surfactant, Conference Proceedings of 5th Anniversary International Conference on Nanomaterials - Research & Application, October 16th - 18th **2013**, Brno, Czech Republic, 595-599.
142. Pilgrová, T.; Pekař, M. Interaction between cationic micelles and hyaluronan. *Materials Science Forum*; Trans Tech Publications Ltd, **2016**; *851*, 26–31.
143. Ambrosio, L.; Borzacchiello, A.; Netti, P.A.; Nicolais, L. Properties of new materials: Rheological study on hyaluronic acid and its derivative solutions. *J. Macromol. Sci. - Pure Appl. Chem.* **1999**, *36 A*, 991–1000.
144. Liang, J.; Krause, W.E.; Liang, J.; Krause, W.E. Rheology and lubricity of hyaluronic acid. *APS* **2007**, N25.009.
145. Ravi Kumar, M.N.V. A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* **2000**, *46*, 1–27.
146. Wang, S.; Shao, G.; Yang, J.; Liu, J.; Wang, J.; Zhao, H.; Yang, L.; Liu, H.; Zhu, D.; Li, Y.; et al. The production of gel beads of soybean hull polysaccharides loaded with soy isoflavone and their pH-dependent release. *Food Chem.* **2020**, *313*, 126095.
147. Wang, Q.Z.; Chen, X.G.; Liu, N.; Wang, S.X.; Liu, C.S.; Meng, X.H.; Liu, C.G. Protonation constants of chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation. *Carbohydr. Polym.* **2006**, *65*, 194–201.
148. Xu, Y.X.; Kim, K.M.; Hanna, M.A.; Nag, D. Chitosan-starch composite film: Preparation and characterization. *Ind. Crops Prod.* **2005**, *21*, 185–192.
149. Huang, S.; Song, X.; Li, T.; Xiao, J.; Chen, Y.; Gong, X.; Zeng, W.; Yang, L.; Chen, C. Pellet coculture of osteoarthritic chondrocytes and infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cells with chitosan/hyaluronic acid nanoparticles promotes chondrogenic differentiation. *Stem Cell Res. Ther.* **2017**, *8*, 264.

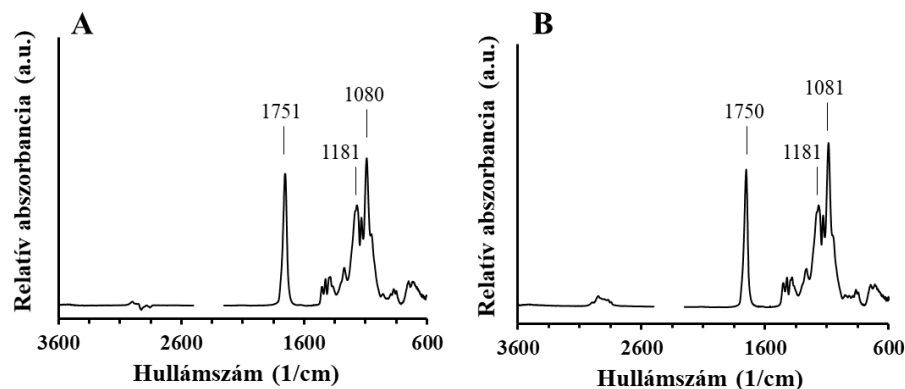
9. Melléklet



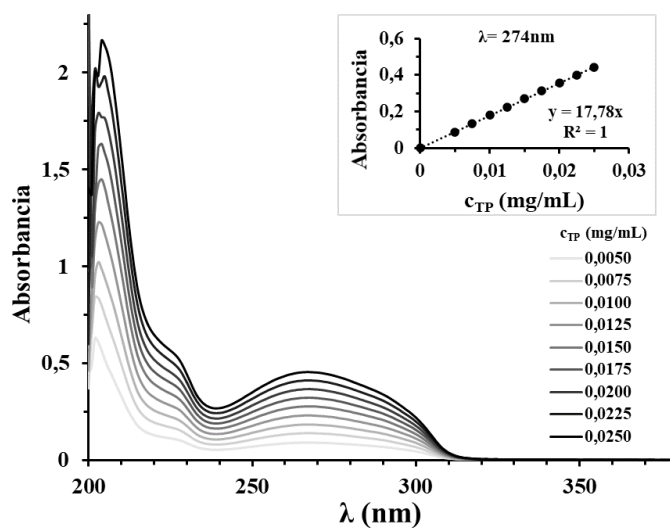
M46. ábra: Hatóanyag nélküli és hatóanyag-tartalmú (A) PLGA65, (B) PLGA75 és (C) PLA méreteloszlási görbéi (*szerves fázis*: $C_{PLA/PLGA} = 10 \text{ mg/mL}$, $V = 1,5 \text{ mL}$; *vizes fázis*: $C_{PLUR} = 0,1 \text{ mg/mL}$, $V = 15 \text{ mL}$; $m_{\text{hatóanyag}} = 7,5 \text{ mg}$)



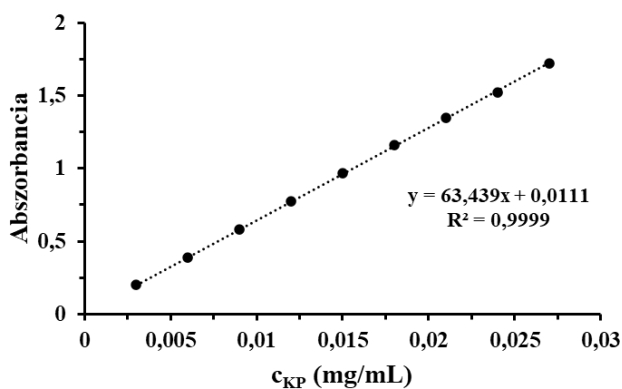
M47. ábra: (A) *D*- α -tokoferol-polietilén-glikol-1000-szukcinát, (B) ketoprofen és (C) (\pm)- α -tokoferol hatóanyagok UV-Vis spektrofotometriás módszerrel meghatározott kalibrációs spektrumai nagytisztaságú Milli-Q vizes közegben és a hozzájuk tartozó kalibrációs egyeneseik



M48. ábra: (A) TP-nélküli és (B) TP-tartalmú PLGA65 részecskék FT-IR spektrumai
(szerves fázis: $c_{\text{PLA}} = 10 \text{ mg/mL}$, $c_{\text{TP}} = 2,5 \text{ mg/mL}$; vizes fázis: $c_{\text{PLUR}} = 0,1 \text{ mg/mL}$)



M49. ábra: A TP UV spektrumai és a meghatározott kalibrációs egyenes PBS közegben
(pH= 7,4; 0,9 % NaCl; $c_{\text{PLUR}} = 1 \text{ mg/mL}$)



M50. ábra: A KP UV-Vis spektrofotometriás módszerrel meghatározott kalibrációs
egyenese PBS közegben (pH= 7,4; 0,9 % NaCl, $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$)

10. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, **Dr. Juhászné Dr. Csapó Editnek**, hogy meglátásaival és szakmai útmutatásával mindvégig támogatta doktori munkámat, illetve lehetővé tette számomra, hogy a kutatási tevékenységemet az általa vezetett Kutatócsoportban végezhessem.

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Tóth Ágotának**, a SZTE TTIK Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék vezetőjének, aki biztosította részemre, hogy a disszertációval kapcsolatos kutatómunkámat az Általa vezetett tanszéken végezhessem. Külön köszönöm **Prof. Dr. Janáky Tamásnak** a lehetőséget, hogy a doktori munkám során közreműködő kutatóként dolgozhattam az általa irányított „Új gyógyszer hatóanyagok és célba juttatások új hordozórendszerekkel” projekt keretein belül.

Köszönet illeti **Prof. Dr. Dékány Imre** akademikust és **Dr. Janovák Lászlót**, akik időnként hasznos elméleti és gyakorlati tanácsokkal segítették kutatómunkám.

Továbbá köszönöm a Kutatócsoportunk valamennyi volt és jelenlegi munkatársának, főként **Turcsányi Árpádnak**, **Dr. Varga Viktóriának**, **Kovács Nikolett Alexandrának**, **Dr. Juhász Ádámnak**, **Janóné Dr. Ungor Ditta Anitának**, **Marótiné Szokolai Hajnalkának** és **Gombár Gyöngyinek**, a kutatómunkámhoz nyújtott segítségüket és baráti támogatásukat, mellyel hozzájárultak a disszertációm megszületéséhez.

Hálás szívvel köszönöm **menyasszonyomnak** a szüntelen gondoskodását és szeretetét, mellyel végig kísérte és segítette egyetemi éveimet. Végül szeretném megköszönni a **családomnak** és **barátaimnak**, hogy kitartó támogatásukkal és biztató szavakkal mindvégig mellettem álltak.

A kutatómunka dologi háttérét a GINOP-2.3.2-15-2016-00060 azonosító számmal rendelkező „Új gyógyszer hatóanyagok és célba juttatásuk új hordozórendszerekkel” pályázati projekt biztosította 2017-től.



11. Publikációs lista

Magyar Tudományos Művek Tára (MTMT) azonosító: 10067813

A doktori munkához közvetlenül kapcsolódó tudományos közlemények:

- [1] Á. Turcsányi, **N. Varga**, E. Csapó, *Chitosan-modified hyaluronic acid-based nanosized drug carriers*, International Journal of Biological Macromolecules, 148 (2020) 218-225, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.118
IF₂₀₁₉= 5,162
- [2] **N. Varga**, Á. Turcsányi, V. Hornok, E. Csapó, *Vitamin E-Loaded PLA- and PLGA-Based Core-Shell Nanoparticles: Synthesis, Structure Optimization and Controlled Drug Release*, Pharmaceutics, 11 (2019), 357, doi: 10.3390/pharmaceutics11070357
IF₂₀₁₉= 4,421
- [3] **N. Varga**, V. Hornok, L. Janovák, I. Dékány, E. Csapó, *The effect of synthesis conditions and tunable hydrophilicity on the drug encapsulation capability of PLA and PLGA nanoparticles*, Colloids and Surfaces B: Biointefaces, 176 (2019) 212-218.
doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.01.012
IF₂₀₁₉= 4,389
- [4] E. Csapó, H. Szokolai, Á. Juhász, **N. Varga**, L. Janovák, I. Dékány, *Cross-linked and hydrophobized hyaluronic acid-based controlled drug release systems*, Carbohydrate Polymers, 195 (2018) 99-106, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.04.073
IF₂₀₁₈= 6,044
- [5] Á. Juhász, **N. Varga**, Á. Turcsányi, E. Csapó, *Relation between Rheological, Structural and Dissolution Properties of Covalently and Ionically Modified Hyaluronic Acid-based Drug Carriers*, Conference Proceedings of 10th Anniversary International Conference on Nanomaterials - Research & Application, October 17th - 19th 2018, Brno, Czech Republic, pp.330-336, ISBN 978-80-87294-89-5.

Σ IF= 20,016

Egyéb tudományos közlemények:

- [6] A. N. Kovács, **N. Varga**, Á. Juhász, E. Csapó, *Serum protein-hyaluronic acid complex nanocarriers: structural characterisation and encapsulation possibilities*, Carbohydrate Polymers, 251 (2020), doi: [10.1016/j.carbpol.2020.117047](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117047)
IF₂₀₁₉= 7,182
- [7] A. N. Kovács, **N. Varga**, Gy. Gombár, V. Hornok, E. Csapó, *Novel feasibilities for preparation of serum albumin-based core-shell nanoparticles in flow conditions*, Journal of Flow Chemistry, 10 (2020), 497-505 doi: [10.1007/s41981-020-00088-4](https://doi.org/10.1007/s41981-020-00088-4)
IF₂₀₁₉= 3,622
- [8] L. Mérai, **N. Varga**, Á. Deák, D. Sebők, I. Szent, Á. Kukovecz, Z. Kónya, I. Dékány, L. Janovák, *Preparation of photocatalytic thin films with composition dependent wetting properties and self-healing ability*, Catalysis Today, 328 (2019) 85–90. doi: [10.1016/j.cattod.2018.10.015](https://doi.org/10.1016/j.cattod.2018.10.015)
IF₂₀₁₉= 5,825
- [9] B. Kutus, **N. Varga**, G. Peintler, A. Lupan, A. A. A. Attia, I. Pálkó, P. Sipos, *Formation of mono- and binuclear neodymium(III)-gluconate complexes in aqueous solutions in the pH range 2-8*, Dalton Transactions 46 (2017) 6049-6058, doi: [10.1039/C7DT00909G](https://doi.org/10.1039/C7DT00909G)
IF₂₀₁₇= 4,099
- [10] B. Kutus, D. Ozsvár, **N. Varga**, I. Pálkó, P. Sipos, *ML and ML₂ complex formation between Ca (II) and D-glucose derivatives in aqueous solutions*, Dalton Transactions 46 (2017) 1065-1074, doi: [10.1039/C6DT04356A](https://doi.org/10.1039/C6DT04356A)
IF₂₀₁₇= 4,099

Σ IF= 24,827

ΣΣ IF= 44,843